

Proteomanalyse
von
Streptococcus pneumoniae

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Dagmar Bracht
aus Wolfenbüttel

1. Referent:	Apl. Prof. Dr. G. S. Chhatwal
2. Referent:	Prof. Dr. D. Jahn
eingereicht am:	31.03.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am:	31.08.2005
	2005

Meiner Mutter

und in Gedenken an meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Die Gattung <i>Streptococcus</i>	3
2.2 Die Art <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
2.3 Infektionen und Epidemiologie von <i>S. pneumoniae</i>	5
2.4 Antibiotika und Impfstoffe	6
2.5 Pathophysiologie	7
2.6 Virulenzfaktoren	8
2.7 Proteomiks	12
2.8 Methoden der Proteomforschung	14
2.9 Zielsetzung der Arbeit	17
3. ERGEBNISSE	18
3.1 Wachstumskurven	18
3.2 Sensitivität des Farbstoffes RuBPS	20
3.3 Etablierung der zweidimensionale Gelelektrophorese für das Proteom von	
<i>S. pneumoniae</i>	20
3.3.1 Optimierung der Proteinextraktion	21
3.3.1.1 Präzipitationsbasierte Proteinextraktion	22
3.3.1.1.1 Eignung verschiedener Proteinpräzipitationen für die Proteomanalyse	22
3.3.1.1.2 TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion	24
3.3.1.2 Fraktionierte Proteinextraktion	25
3.3.2 Vergleich der untersuchten Proteinextraktionen für die Eignung in der vergleichende	
Proteomanalyse	27

3.4 Erstellung von Mastergelen für das Proteom von <i>S. pneumoniae</i> D39	28
3.4.1 Sekretom-Analyse von <i>S. pneumoniae</i> D39.....	30
3.4.2 Analyse des intrazellulären Proteoms von <i>S. pneumoniae</i> D39.....	36
3.4.3 Analyse des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms (MP1) von <i>S. pneumoniae</i> D39	46
3.4.4 Analyse des Subproteoms der schwer löslichen Proteine (MP2) von <i>S. pneumoniae</i> D39	51
3.4.5 Auswertung der Proteomdaten von <i>S. pneumoniae</i> D39.....	53
3.5 Vergleichende Proteomanalyse zwischen <i>S. pneumoniae</i> D39 und der isogenen <i>pavA</i>-Mutante <i>S. pneumoniae</i> PN28	58
3.6 Analyse von <i>glnQ</i> (spr0408).....	64
3.6.1 Analyse des Genlokus von <i>glnQ</i> (spr0408).....	64
3.6.2 Southern Blot Analyse	65
3.6.3 Analyse der Aminosäuresequenz von spr0408	66
3.6.4 Klonierung von <i>glnQ</i> (spr0408)	68
3.6.5 Produktion und Aufreinigung des Proteins GlnQ (spr0408).....	68
3.6.6 Immunblot Analyse von GlnQ (spr0408).....	70
3.6.7 Konstruktion einer <i>S. pneumoniae</i> D39 <i>glnQ</i> -Insertions-Mutante.....	71
3.6.8 Virulenzstudien der <i>glnQ</i> -(spr0408)-Mutante im Sepsismodell der Maus	72
3.7 Immunologische Untersuchungen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4. DISKUSSION	74
4.1 Methoden-Etablierung.....	74
4.2 Mastergele von <i>S. pneumoniae</i> D39	76
4.3 Vergleichende Proteomanalyse des <i>S. pneumoniae</i> Wildtyps D39 mit der isogenen <i>S. pneumoniae</i> Mutante D39 Δ <i>pavA</i>	85
4.4 Funktion von GlnQ (spr0408) in der Pathogenität von <i>S. pneumoniae</i>	85
4.5 Immunologische Untersuchungen	86
4.6 Ausblick.....	87

5. MATERIAL UND METHODEN	88
5.1 Material und Chemikalien.....	88
5.1.1 Reagenzien	88
5.1.2 Puffer und Lösungen, soweit nicht in den Methoden beschrieben	88
5.1.3 Antikörper und Antiseren.....	89
5.1.4 Kulturmedien.....	90
5.1.4.1 Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>S. pneumoniae</i> -Stämme	90
5.1.4.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>Escherischia coli</i> Stämme.....	95
5.1.4.3 Stammhaltung von Bakterien	95
5.1.5 Bakterienstämme	95
5.2 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen.....	96
5.2.1 Zellaufschluss.....	96
5.2.2 Herstellung von Bakterienlysaten	96
5.2.3 Proteinbestimmung.....	97
5.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli <i>et al.</i> , 1970)...	97
5.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (Klose, 1975; O'Farrell, 1975).....	98
5.2.5.1 1.Dimension - Isoelektrische Fokussierung	98
5.2.5.2 Äquilibration	102
5.2.5.3 2. Dimension – SDS-PAGE	102
5.2.6 Proteinfällungen	103
5.2.6.1 Fällung von Proteinen mit organischen Lösungsmitteln.....	103
5.2.6.2 Ammoniumsulfat-Fällung	104
5.2.6.3 Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)	105
5.2.7 Probenaufarbeitung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese	105
5.2.7.1 TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion	106
5.2.7.2 Fraktionierte Proteinextraktion	107
5.2.7.3 Isolierung sekretorischer Proteine	109
5.2.8 Proteinfärbungen	109
5.2.8.1 Kolloidales Coomassie	109
5.2.8.2 Silberfärbung (nach Shevchenko <i>et al.</i> ,)	109
5.2.8.3 Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffes RuBPS (Rabilloud, 2001)	110
5.2.8.4 Fluoreszenz-Färbung mit RuBPS.....	111
5.2.9 Western Blot und Immunoblot (Towbin <i>et al.</i> , 1979).....	111

5.2.10	Färbung von PVDF Membranen	112
5.2.11	Produktion von Proteinen	112
5.2.12	Affinitätschromatographie	113
5.2.13	Proteindialyse	114
5.2.14	Massenspektrometrie	115
5.2.14.1	Verdau der Proteine und Elution der Peptide	115
5.2.14.2	Aufreinigen und Entsalzen der Peptide	116
5.2.14.3	MALDI-TOF-MS	117
5.2.14.4	Auswertung der Massenspektren	118
5.3	Molekularbiologische Methoden	118
5.3.1	Plasmide	118
5.3.2	Oligonukleotide	118
5.3.3	Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)	119
5.3.4	Photometrische Vermessung von Nukleinsäuren	120
5.3.5	Polymerasekettereaktion (PCR, Saiki et al., 1985)	120
5.3.6	Präparation von DNA	121
5.3.6.1	Präparation von genomischer DNA von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	121
5.3.6.2	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	121
5.3.7	Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel	121
5.3.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	122
5.3.9	Klonierungs-Methoden	122
5.3.9.1	Klonierung von PCR-Produkten	122
5.3.9.2	DNA-Restriktionsverdau	123
5.3.9.3	Dephosphorylierung	123
5.3.9.4	Ligation	123
5.3.10	Methoden zur Transformation von Bakterien	124
5.3.10.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	124
5.3.10.2	Transformation von <i>E. coli</i>	124
5.3.10.3	Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	124
5.3.11	DNA-Sequenzierung	125
5.3.12	Southern Blot (Southern, 1975)	125
5.3.13	DNA-DNA-Hybridisierung	126
5.3.14	Herstellung von DNA-Sonden	126
5.3.15	Computerunterstützte Datenanalyse	127

5.4 Mauseinfektion	127
6. LITERATUR	128
7. ANHANG	142
Abkürzungen	142

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Proteom des humanpathogenen Erregers *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) analysiert und für vergleichende Proteomstudien verwendet. Dazu wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-GE) für die Proteomanalyse etabliert. Es wurden zunächst die Methoden für die Proteinextraktion von *S. pneumoniae*, die Proteintrennung und die Proteinfärbung optimiert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine fraktionierte Proteinextraktion für die Unterteilung des Gesamtproteoms von *S. pneumoniae* in drei weniger komplexe Subproteome entwickelt. Die Proteomanalyse erfolgte getrennt für das Zytoplasma, die Membranproteinfraktion und das Sekretom. Für die Analyse des Sekretoms unter definierten in vitro Bedingungen mussten die Pneumokokken in chemisch definiertem Medium (CDM) kultiviert werden. Die Kultivierung erfolgte unter Berücksichtigung der von Pneumokokken induzierten Autolyse. Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden 2000 Proteinspots analysiert. Davon konnten 1120 identifiziert werden, die insgesamt 240 verschiedene Proteine repräsentierten. Viele der identifizierten Proteine waren in mehr als einem Subproteom präsent. Spezifisch für die Subproteome wurden 120 Zytoplasmaproteine, 22 Membran-assoziierte Proteine und 4 Proteine des Sekretoms identifiziert. 15 der insgesamt identifizierten Proteine hatten eine Signalsequenz und eines enthielt ein LPXTG-Motiv. Aus den erhaltenen Daten wurden unter Verwendung des Programms Phoretix Mastergele erstellt, die eine Evaluierung der erhaltenen Daten in Korrelation zum Genom zuließen. Die Mastergele dienten anschließend als Grundlage für eine vergleichende Proteomanalyse. Das Proteom des virulenten *S. pneumoniae* Stammes D39 wurde im subtraktiven Ansatz mit dem Expressionsprofil einer isogenen *pavA*-Mutante verglichen. Vorherige Arbeiten zeigten, dass die Inaktivierung des *pavA*-Gens zu einer Verminderung der Virulenz im experimentellen Meningitis-Modell und Sepsis-Modell der Maus führte. Des weiteren war die Adhärenz an Wirtszellen bei PavA-defizienten Pneumokokken reduziert. Unterschiede in den Proteomen des Wildtypstamms und der isogenen *pavA*-Mutante sollten potenziell mit der Virulenz von Pneumokokken korreliert sein. Es konnten zwei differentiell regulierte Proteine detektiert werden, von denen ein Protein identifiziert werden konnte. Das regulierte Protein, spr0408 in der Genomdatenbank von *S. pneumoniae* R6, ist die ATP-bindende Domäne eines ABC-Glutamintransporters. Für die Komponenten des ABC-Glutamintransporters von Gruppe B Streptokokken wurde eine Beteiligung an der Virulenz beschrieben (Tamura *et al.*, 2002). Das *glnQ*-Gen (spr0408) wurde durch Mutagenese in verschiedenen Pneumokokkenstämmen inaktiviert.

Virulenzstudien von *S. pneumoniae* D39 und der isogenen *glnQ*-Mutante im Sepsis-Modell der Maus zeigten keine signifikant attenuierte Virulenz der Mutante.

2. Einleitung

2.1 Die Gattung *Streptococcus*

Streptokokken sind rundliche bis ovale Bakterien, die miteinander Ketten bilden. Sie sind gram-positiv, unbeweglich und bilden keine Dauerformen. Sie gewinnen Energie aus der homofermentativen Milchsäuregärung von Glukose und Laktose und gehören daher zur Ordnung der Milchsäurebakterien. Aufgrund ihrer Anpassung an nährstoffreiche Habitate, wie Milch, Darm und Schleimhäute von Menschen und Säugetieren, haben sie bei Kultivierungen einen hohen Bedarf an Supplinen und Nährstoffen (Schlegel, 1992). Etwa 1874 konnte Billroth erstmalig in Präparaten von Wundeiterungen diese morphologisch auffälligen Keime sehen und gab ihnen aufgrund ihrer kettenförmigen Anordnung den Namen "Streptokokken". Die Einteilung der Streptokokken wurde aufgrund der vielen unterschiedlichen Krankheitsbilder bereits 1903 durch Schottmüller vorgenommen, der das Hämolyseverhalten der Bakterien auf Blutagar als Einteilungskriterium nutzte. Die Art der Veränderung von Blutagar durch Streptokokkenkolonien ist auch heute noch ein Einteilungskriterium innerhalb dieser Gattung. Die unterschiedlichen Formen der Hämolyse wurden um 1919 von Braun wie folgt definiert:

- α -Hämolyse: Sie entspricht der Vergrünung von Blutagar. Um die Kolonien herum entstehen grüne Höfe, in deren Bereich das Hämoglobin zum Methämoglobin reduziert wurde, während die Erythrozytenmembranen weitgehend intakt sind.
- β -Hämolyse: Sie zeigt sich durch eine relativ große, scharf begrenzte Zone vollständiger Hämolyse um die Kolonien, in der die Erythrozyten aufgelöst sind und der Blutfarbstoff abgebaut wurde, so dass eine klare Zone im sonst trüben Blutagar entsteht. Die β -Hämolyse beruht auf der Wirkung verschiedener Hämolsine, die von den Streptokokken gebildet werden.
- γ -Hämolyse: Die Streptokokken-Kolonien auf Blutagar zeigen keine makroskopisch sichtbaren Hämolysezonen.

Die Einteilung der Streptokokken in die Lancefield-Gruppen A-V erfolgt aufgrund eines in der Zellwand lokalisierten Antigens (Kayser *et al.*, 1998; Lancefield, 1933). Bei dem Lancefield-Antigen handelt es sich entweder um polymere Kohlenhydrate oder

Lipoteichonsäuren, welches fast alle Streptokokken enthalten (Murray *et al.*, 1990). Die α -hämolyisierende Art *Streptococcus pneumoniae* enthält keine Lancefield-Antigene und unterscheidet sich auch in der Morphologie von anderen Streptokokken.

2.2 Die Art *Streptococcus pneumoniae*

Bereits 1881 isolierten Pasteur in Frankreich und Sternberg in den USA unabhängig voneinander zum ersten Mal das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Die auch als Pneumokokken bezeichnete Art umfasst oval bis lanzettförmige Kokken mit einer Größe von 0,5-1,25 μm , die paarweise oder in kurzen Ketten auftreten. Die Pneumokokken sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben, die einen wichtigen Faktor in der Virulenz der Pneumokokken darstellt (Watson und Musher, 1990). Pneumokokken-Stämme ohne Kapsel sind in der Virulenz von invasiven Krankheiten stark attenuiert. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der Kapselpolysaccharide werden heute über 90 serologische Typen unterschieden (Lund und Henrichsen, 1978). Bekapselte Stämme bilden glatte, schleimige Kolonien (s-Form) mit einer zentralen kraterförmigen Eindellung, die auf Autolyse der Pneumokokken bei einer kritischen Zelldichte zurückzuführen ist. Pneumokokken ohne Kapsel haben dagegen eine raue Oberfläche (r-Form).

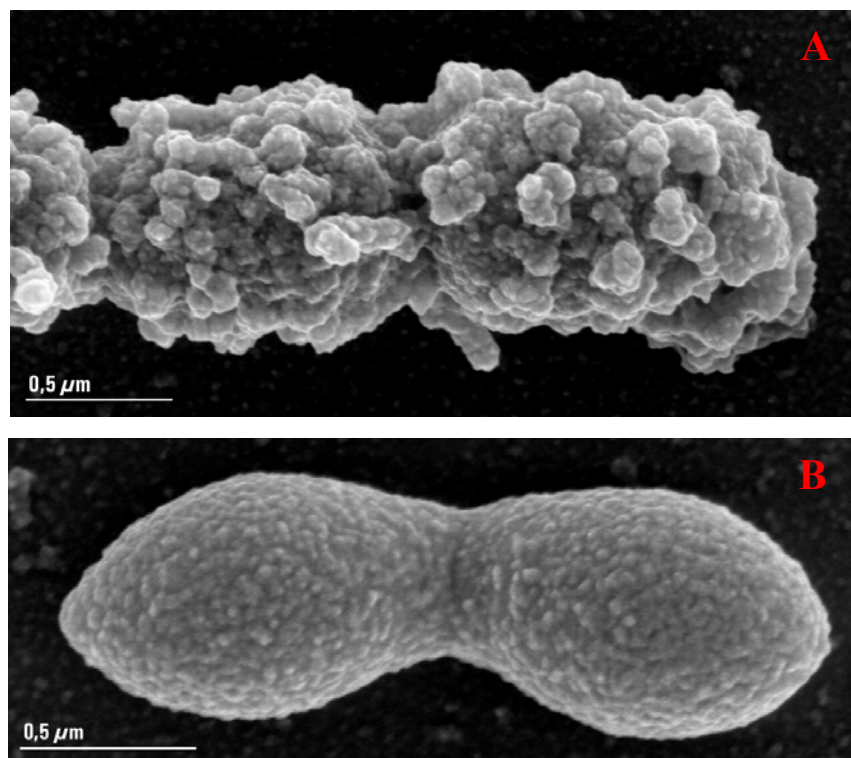


Abbildung 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pneumokokken mit (A) und ohne (B) Kapsel (M.Rohde, GBF Braunschweig)

2.3 Infektionen und Epidemiologie von *S. pneumoniae*

Die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts des Menschen sind das natürliche Habitat von *S. pneumoniae*. Ungefähr 40-70% der gesunden Erwachsenen werden zeitweise von meist verschiedenen Serotypen der Pneumokokken kolonisiert, ohne dass es zu einer Infektion kommt (Kayser, 1998). Die Rate der asymptomatischen Träger ist abhängig vom Alter, so sind Kinder öfter Keimträger als Erwachsene (Lloyd-Evans *et al.* 1996). Die Übertragung erfolgt primär über Tröpfcheninfektion. Einige Faktoren, die in der Adhärenz und Kolonisierung von Pneumokokken involviert sind, wurden bereits identifiziert. Bis heute ist nur wenig bekannt über die Mechanismen, die zur Transformation vom harmlosen Kommensalen zum pathogenen Erreger führen.

S. pneumoniae ist einer der weltweit häufigsten Verursacher von bakteriellen Infektionen. Die häufigsten invasiven Krankheiten sind Pneumonie (Lungenentzündung), Bakteriämie und Meningitis (Hirnhautentzündung). Zu den nicht-invasiven Krankheiten zählen Otitis media (Mittelohrentzündung) und Sinusitis (Nasennebenhöhlenentzündung). Im Gegensatz zu den invasiven Pneumokokken-Infektionen haben die nicht-invasiven Erkrankungen einen weniger schweren Verlauf, treten allerdings sehr viel häufiger auf. In den USA werden jährlich 7 Mio. Fälle von Otitis media durch Pneumokokken verursacht. Obwohl generell alle Altersgruppen betroffen sind, treten Pneumokokken-Infektionen besonders bei Kleinkindern bis zu 2 Jahren und bei Personen über 65 Jahren auf. Ein erhöhtes Risiko besteht auch bei Menschen mit pulmonalen Grunderkrankungen oder allgemeinen Abwehrschwächen wie sie bei HIV-Infektion, Chemotherapie, Immunsuppression, Krebs, Diabetes mellitus oder Alkoholismus auftreten (Plotkowski, 1986; Kayser *et al.*, 1997; Musher, 1992). Weltweit werden jährlich 2,6 Mio. Todesfällen bei Kindern unter fünf Jahren durch Infektionen des Respirationstraktes verursacht. Pneumokokken sind über einer Millionen dieser Infektionen zuzuschreiben. Die meisten Fälle treten bei Kindern aus Entwicklungsländern auf.

Pneumonien sind in den industrialisierten Ländern die häufigste Todesursache unter allen Infektionskrankheiten. Insgesamt stehen sie sogar an Platz 5 der Todesursachenstatistik. Die Sterblichkeitsrate von Pneumokokken-Pneumonien für Erwachsene beträgt 10 % - 20 %. In den Risikogruppen steigt diese auf bis zu 50 %. In den USA sterben von 2 Millionen Erkrankten jährlich ca. 50 000 Menschen. In den Entwicklungsländern zählen die Lungenentzündungen zu den häufigsten Todesursachen. Das deutsche Statistische Bundesamt schätzt die Zahl der jährlichen Pneumoniefälle in Deutschland auf 350 000 bis 500 000, davon musste ein Drittel stationär behandelt werden. Damit führte die ambulant erworbene Pneumonie häufiger zur stationären Aufnahme als Herzinfarkt und Schlaganfall. Infolge einer

infektiösen Pneumonie kann es zu Hirnhautentzündungen (Meningitis) und Eiteransammlungen im Gehirn, so genannten Hirnabszessen kommen. In seltenen Fällen kommt es zu entzündlichen Veränderungen am Herzen (Endokarditis, Perikarditis). Nach *Neisseria meningitidis* ist *S. pneumoniae* der häufigste Erreger der akuten bakteriellen Meningitis. In den USA sind bis zu 19 % der jährlich registrierten 3000-6000 Meningitis-Fälle durch Pneumokokken verursacht. Die Sterblichkeitsrate bei Pneumokokken-Meningitiden beträgt etwa 30 %, kann aber bei älteren Menschen bis 80 % betragen (von Kries et al., 2000). In Deutschland erkranken jährlich durchschnittlich 200 Kinder unter 16 Jahren an einer akuten Pneumokokken-Meningitis.

2.4 Antibiotika und Impfstoffe

Die Antibiotika-Therapie mit Penicillin G ist bei der Behandlung von Pneumokokken-Infektionen immer noch erste Wahl (Musher, 1992). In den letzten 10-20 Jahren hat die Resistenzentwicklung unter den Pathogenen des Respirationstraktes weltweit stark zugenommen. Der weitverbreitete Einsatz von Antibiotika in der ambulanten Medizin hat dabei wesentlich zur Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen beigetragen. Pneumokokken haben bereits gegen die meisten für ihre Behandlung eingesetzten Antibiotika Resistenzen entwickelt (Pallars, 1987; Brandis, 1994). Dazu zählen neben den β -Laktamen auch die Makrolide, die Lincosamide, Trimethoprim/Sulfamethoxazol sowie die Tetracykline. Häufig treten Resistenzen gegen mehr als nur eine Antibiotikaklasse auf. In Deutschland sind regional bis zu 15 Prozent der Pneumokokken-Stämme gegen Penicillin G und bis zu 30 % gegen häufig eingesetzte Makrolide wie beispielsweise Clarithromycin resistent. In Deutschland werden durchschnittlich 10 % der Pneumokokken mit Resistenzen registriert. In Spanien, Frankreich, Griechenland und Ungarn beträgt die Resistenzrate bei Penicillin teilweise über 50 %, oft verbunden mit einer Makrolid-Resistenz von bis zu 60 % (Reinert et al, 2001).

Eine Alternative zu Antibiotikatherapie besteht in präventiven Maßnahmen wie Impfungen. Bereits 1945 konnten McLeod und Mitarbeiter zeigen, dass die Immunisierung mit den Kapselpolysacchariden von *S. pneumoniae* einen effektiven Schutz gegen weitere Infektionen durch identische Serotypen vermittelt. In epidemiologischen Studien zeigte sich, dass eine begrenzte Anzahl von Serotypen für die überwiegenden Fälle der Infektionen verantwortlich ist. Anhand dieser Daten wurden die für ein Vakzin in Frage kommenden Serotypen zusammengestellt. 1977 wurde in den USA die Lizenz für einen 14-valenten Impfstoff erteilt,

der aus Kapselpolysacchariden von 14 verschiedenen Pneumokokken-Serotypen zusammengesetzt war. 1983 wurde Pneumovax® eingeführt, der aus den Kapselpolysacchariden von 23 verschiedenen Serotypen (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F und 33F) zusammengestellt ist (Schiffman, 1983). Die Immunisierung mit Polysacchariden führt zu einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort. Es werden keine Gedächtniszellen angelegt, die bei einer erneuten Pneumokokken-Infektion eine schnelle Immunabwehr induzieren. Die Klasse der Immunglobuline G2 (IgG2) vermittelt die Immunantwort gegen Polysaccharide. Kinder unter zwei Jahren bilden noch keine IgG2 und tragen daher keinen Immunschutz (Fedson, 1999; Van Dam *et al.*, 1990). Sie stellen zusammen mit älteren Menschen über 65 Jahren weiterhin eine Risikogruppe dar (Shapiro *et al.*, 1991). In Anlehnung an den *Hämophilus-influenzae*-TypB-Impfstoff wurde die Forschung auf dem Gebiet der Konjugatvakzine mit einem immunogenen Trägerprotein intensiviert. Im Mai 2001 wurde das 7-valente Konjugatvakzin Prevnar® in Deutschland zugelassen. Das Trägerprotein dieses Vakzins besteht aus einem nicht toxischen Analogon des Diphtherietoxins CRM₁₉₇ (crossreactive molecule 197) an dem die antigenen Determinanten von sieben Polysaccharidtypen der Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F und 18C gebunden ist. Das Vakzin zeigte in den durchgeführten Studien gute Wirksamkeit und Schutz bei Kinder unter zwei Jahren, für die bisher kein Impfstoff zur Verfügung stand (Rennels *et al.*, 1998). Da ein Konjugatimpfstoff nur eine begrenzte Anzahl von Serotypen umfasst, konzentriert sich die Impfstoffforschung auf immunogene Proteinbestandteile der Pneumokokken, die unabhängig vom Serotyp auf der Oberfläche vorkommen.

2.5 Pathophysiologie

Die Pneumokokken-Infektion beginnt nach der Aerosol-Übertragung mit der Anheftung und der Kolonisierung des Nasopharynx. Von dort aus können die Pneumokokken in die Eustachische Röhre eindringen, weiter in die Ohrhöhle vordringen und eine Mittelohrentzündung auslösen. Vom Nasopharynx aus können die Bakterien bei Versagen der spezifischen und unspezifischen Abwehr der Schleimhäute in die Lunge des Trägers gelangen (Boulnois, 1992). Die Pneumokokken überleben in der Lunge, da sie aufgrund ihrer Kapsel vor der Phagozytose der Makrophagen geschützt sind. Durch Einwanderung von Phagozyten und lymphoiden Zellen verstärkt sich die Entzündungsreaktion. Dies führt zur Schädigung des Lungengewebes und hat im schlimmsten Fall den Zusammenbruch des Gasaustausches zur

Folge. Eine Bakteriämie erfolgt durch Übertritt der Bakterien in das Blut und anschließender Verbreitung im Blutkreislauf. Bei Überwindung der Blut-Hirn-Schranke droht eine Meningitis (Tuomanen *et al.*, 1995; Tuomanen, 1993).

Die meisten Symptome, die bei Pneumokokken-Infektionen auftreten, werden durch die wirtseigene Abwehr hervorgerufen und wahrscheinlich ist auch die hohe Sterblichkeitsrate auf die Entzündungsreaktion des Wirtes im Zuge der Infektion zurückzuführen (Musher, 1992). Bei Lyse der Bakterien werden Peptidoglycan-Fragmente und die Teichonsäuren der Zellwände freigesetzt (Bruyn *et al.*, 1992). Diese Zellwandkomponenten lösen eine starke Immunantwort aus und verstärken die Entzündungsreaktion. Gleichzeitig wird das thiol-aktivierte Protein Pneumolysin freigesetzt. Pneumolysin ist (Boulnois, 1992) für eukaryontische Zellen schon in niedriger Konzentration toxisch und fördert durch Stimulierung der Zytokin-Produktion (Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor α) in Monocyten die Entzündungsreaktion im Wirt (Houldsworth *et al.*, 1994; Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989).

2.6 Virulenzfaktoren

Die Pathogenese ist ein sehr dynamischer Prozess, der durch viele Faktoren beeinflusst wird. Pneumokokken besitzen verschiedene Virulenzfaktoren, die in der Adhäsion und Invasion von humanen Epithelzellen eine Funktion haben (Salyers und Whitt, 1994). Bei den meisten der bislang charakterisierten Virulenzfaktoren handelt es sich um Zelloberflächenstrukturen und um einige zytoplasmatische Proteine. Es wird geschätzt, dass Pneumokokken über 500 Oberflächenproteine besitzen (Wizemann *et al.*, 2001). Die in den Infektionsprozess involvierten Faktoren und Bestandteile sind in ihrer Gesamtheit noch nicht identifiziert.

Das **Kapselpolysaccharid** wird als der Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken betrachtet (AlonsoDe Velasco *et al.*, 1995; Koedel *et al.*, 2002). Die Kapsel besitzt eine anti-phagozytäre Funktion und inhibiert die alternative Komplementkaskade. (Bruyn *et al.*, 1992; Fine, 1975; Chudwin *et al.*, 1985). Dies ermöglicht es dem Erreger im Blutstrom zu überleben.

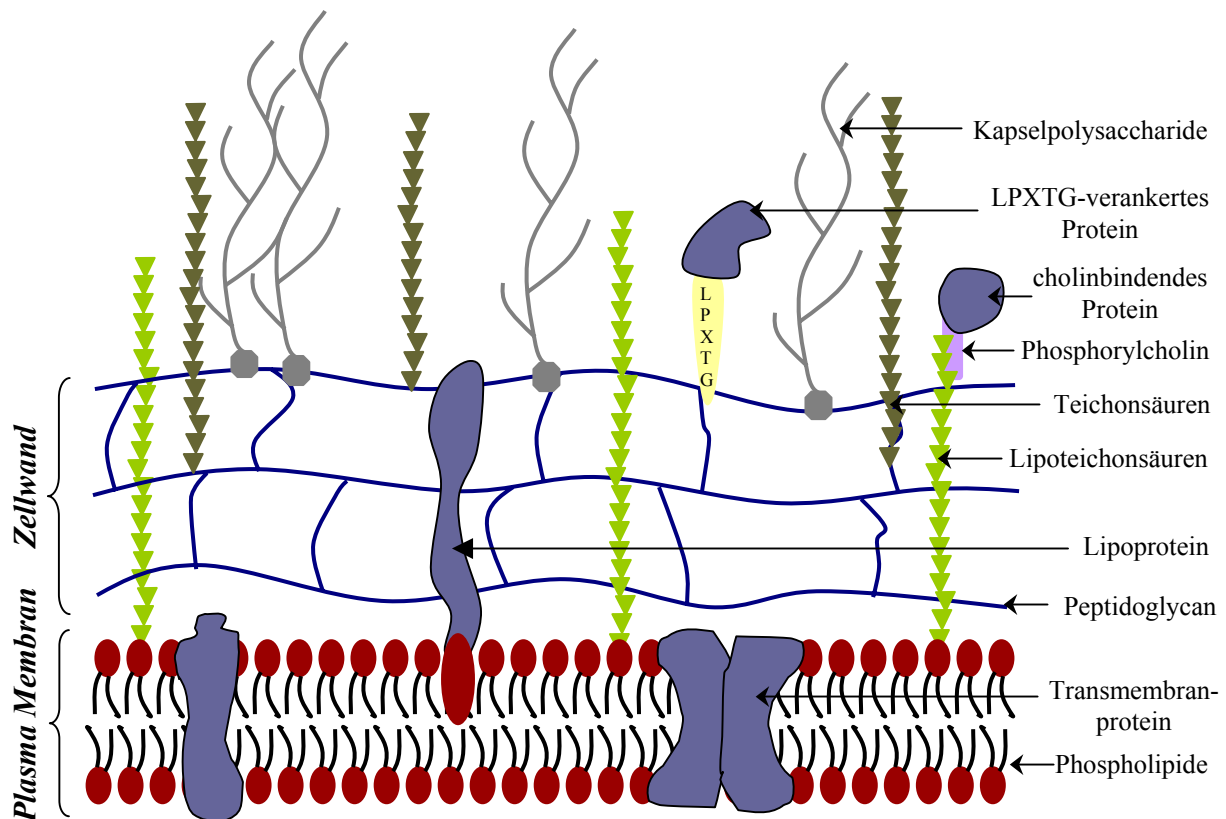


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Oberflächenstrukturen von *Streptococcus pneumoniae*

Die Polysaccharide der Kapsel sind an die Zellwand der Pneumokokken gebunden. Die Zellwand besteht wie bei allen Gram-positiven Bakterien aus dem Peptidoglykan Murein (Schlegel, 1992). Die Entzündungsprozesse im Laufe einer Pneumokokken-Infektion werden durch die nach der Lyse freigesetzten **Komponenten der Zellwand** verursacht (Geelen *et al.*, 1993). Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren sind wesentliche Bestandteile der Zellwand. Diese enthalten bei Pneumokokken Phosphorylcholin (Rosenow *et al.*, 1997; Alonso De Valesco *et al.*, 1995), welches eine nicht-kovalente Bindung von Proteinen (sogenannte cholinbindende Proteine) vermittelt (Yother *et al.*, 1986).

Zur Familie der cholinbindenden Proteine gehört das Autolysin **LytA** (Garcia *et al.*, 1986; Diaz *et al.*, 1989). Autolysin trägt zur Gewebeschädigung durch Lyse der Pneumokokken und Freisetzung zytoplasmatischer und zellwandassoziiierter Virulenzfaktoren wie Pneumolysin und Neuraminidasen (Lock *et al.*, 1988; Johnson, 1977) bei. Für die anderen Autolysine **Lyt B** und **Lyt C** konnten Effekte bei Kolonisation und Pathogenität im Rattenmodell gezeigt werden (Gosink *et al.*, 2000). **PspA** (**p**neumococcal **s**urface **p**rotein **A**) ist ebenfalls ein cholinbindendes Oberflächenprotein von *S. pneumoniae*. Dieses Protein trägt zur Virulenz bei, indem es die Anlagerung von Komplement C3b verhindert und so die Aktivierung des

alternativen Komplementaktivierungsweges unterbindet (Tu *et al.*, 1999). Dadurch wird die komplementvermittelte Phagozytose eingedämmt. Weiterhin fungiert PspA als Laktoferrin-Bindungsprotein (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Laktoferrin ist ein eisenspeicherndes Glycoprotein der menschlichen Schleimhaut. Es dient den Pneumokokken eventuell als Eisenquelle und ermöglicht ihnen das Überleben in den mukosalen Epithelien (Talkington *et al.*, 1991). Das cholinbindende Protein CbpA, besser unter dem Namen **SpsA** (*Streptococcus pneumoniae* sekretorisches IgA-Bindungsprotein) bekannt, bindet an die freie sekretorische Komponente (SC), welche wiederum an das sekretorische Immunglobulin A (SIgA) bindet (Hammerschmidt *et al.*, 1997). SIgA ist bei der Abwehr von Infektionserregern eine wichtige Komponente (Underdown und Schiff, 1986). Die Expression von SpsA und die Bindung an SC konnte für 73 % der getesteten Pneumokokken-Isolate nachgewiesen werden (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Das Bindungsmotiv für SC/SIgA konnte auf ein Hexapeptid eingeschränkt werden (Hammerschmidt *et al.*, 2000), welches humanspezifisch die Interaktion zwischen SIgA und freier SC mit SpsA (Hammerschmidt *et al.*, 2000) vermittelt. SpsA bindet des weiteren an den humanen Faktor H (FH) (Dave *et al.*, 2004). Je nach Pneumokokken-Stamm gibt es 13 bis 16 cholinbindende Proteine (Cbp), deren Funktion bis heute zum Teil nicht weiter bekannt ist. **CbpD**, **CbpE** und **CbpG** scheinen an Adhärenz und Kolonisierung von Pneumokokken beteiligt zu sein (Gosink *et al.*, 2000).

Das Zytotoxin **Pneumolysin** trägt zur inflammatorischen Reaktion bei und schädigt Zellen (Johnson *et al.*, 1980; AlonsoDeValesco *et al.*, 1995). Das Toxin ruft die Bildung von oligomeren Poren in cholesterinhaltigen Membranen von eukaryontischen Zellen hervor (Rossjohn *et al.*, 1998; Rubins *et al.*, 1996). Pneumolysin stimuliert die Freisetzung des Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukinen durch Makrophagen (Houldsworth *et al.*, 1994). Es bindet unspezifisch IgG und aktiviert so die Komplementkaskade (Rossjohn *et al.*, 1998). Pneumolysin aktiviert die Phospholipase A2 und induziert so die Entzündungsreaktion (Rubins *et al.*, 1996). In den Lungen inhibiert Pneumolysin die Ziliarbewegungen der respiratorischen Epithelzellen und erhöht die vaskuläre Permeabilität durch Schädigung des Gefäßendotheliums (Feldmann *et al.*, 1990). Durch seine Zytotoxizität auf das respiratorische Epithel und das Endothel zerstört Pneumolysin Gewebebarrieren, die dem mechanischen Widerstand dienen und erleichtert den Pneumokokken so die Penetration durch Gewebebarrieren (Rubins *et al.*, 1998). Weiterhin konnte experimentell gezeigt werden, dass Pneumolysin die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke bewirkt und entscheidend zur Penetration der Pneumokokken aus dem Blutbahn ins Gehirn sowie zur Entwicklung eines Hirnödems beiträgt (Zysk *et al.*, 2001).

Das zytoplasmatische Protein **Enolase** ist ein zentraler Bestandteil der Glykolyse. Es konnte aber auch auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden. Enolase ist in der Lage, Plasminogen zu binden (Bergmann *et al.*, 2001). Plasminogen ist eine wichtige Komponente der Fibrinolyse (Collen und Verstraete, 1975). Von wirtseigenen Faktoren zum Plasmin aktiviert, spaltet Plasmin Fibrin und Proteine der Zellmatrix.

PavA (**p**neumococcal **a**dhesion and **y**irulence protein **A**) ist ein weiterer Virulenzfaktor von Pneumokokken. Es ist ein Oberflächenprotein von *S. pneumoniae*. Die Mechanismen der Sekretion und Lokalisation von PavA an die Zelloberfläche sind noch ungeklärt, da es weder eine Signalsequenz für den klassischen Sekretionsweg noch ein Motiv für die Zellwandverankerung vorhanden sind. PavA bindet immobilisiertes Fibronektin, eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix. Mutanten mit einer Inaktivierung des *pavA*-Gens zeigen im Mausmodell eine stark abgeschwächte Virulenz (Holmes *et al.*, 2001). Die **Neuraminidasen** NanA und NanB sind ebenfalls Oberflächenproteine von *S. pneumoniae* (Camara *et al.*, 1994). Diese Enzyme spalten Sialinsäure von Glycolipiden, Glycoproteinen und Oligosacchariden und tragen zur Zytotoxizität der Pneumokokken bei (Berry *et al.*, 1996). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Neuraminidasen in der Pathogenität von Pneumokokken involviert sind (Lock *et al.*, 1988). Bei der **Hyaluronidase** handelt es sich um ein weiteres Enzym der Pneumokokken (Humphrey, 1948). Hyaluronidase katalysiert die Degradation von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix und begünstigt die Ausbreitung der Pneumokokken in Geweben (Boulnois, 1992).

S. pneumoniae besitzt auf der Oberfläche **Zink-Metalloproteasen** (Zmp). Drei der Zmps sind in die Virulenz der Pneumokokken involviert. **ZmpC** ist in nur 25 % der getesteten Penumokokken-Stämme vorhanden. ZmpC besitzt eine Spaltungsaktivität ähnlich der humanen Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9), die in Degradationsprozesse extrazellulärer Matrixbestandteile involviert ist (Oggioni *et al.*, 2003). Für **ZmpB** wurde eine Funktion in der Induzierung der inflammatorischen Reaktion im unteren Respirationstrakt beschrieben (Blue *et al.*, 2003). Die **IgA1-Protease** gehört ebenfalls zu den Zink-Metalloproteasen (Poulsen *et al.*, 1996) und ist auch in anderen Erregern einer bakteriellen Meningitis (*Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis*) vorhanden (Killian *et al.*, 1996). Die IgA1-Protease spaltet humanes IgA in ein Fab und ein Fc Fragment. Durch diese Enzymaktivität wird es den Bakterien erleichtert, die Mukosa des oberen Respirationstraktes zu kolonisieren (Poulsen *et al.*, 1996).

ABC-(adenosinetriphosphate-binding cassette) Transportproteine sind essentiell für die Aufnahme und Abgabe von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Einige der Transporter haben auch eine Bedeutung für die bakterielle Virulenz. So führte die Inaktivierung der Gene *piu* und *pia*, die beide für ABC-Transporter für Eisenaufnahme kodieren zu einer stark abgeschwächten Virulenz im Mausmodell für Sepsis und Pneumonie (Brown *et al.*, 2001). **PsaA** ist die Lipoprotein-Komponente eines ABC-Transporters, der verantwortlich für den Mangan Transport ist (Dintilhac *et al.*, 1997). Mutationen im *psaA*-Gen führen zu Verminderung in der Virulenz und der Adhäsion von Pneumokokken (Berry and Paton, 1996; Sampson *et al.*, 1994, Talkington *et al.*, 1996). Die **AmiA-AliA/AliB** Oligopeptid Permease ist ebenfalls Teil eines ABC-Transporters. Dieser Komplex ist zwar nicht in die Virulenz involviert, spielt aber eine Rolle bei der Kolonisierung des Nasopharynx (Kerr *et al.*, 2004).

Die Identifikation von neuen Virulenzfaktoren ist für die Aufklärung der Pathogenese von *S. pneumoniae* notwendig. In den unterschiedlichen Phasen der Pathogenese, wie Kolonisierung, Invasion, Persistenz im Blutstrom, Penetration von Geweben sind unterschiedliche Faktoren von Bedeutung.

2.7 Proteomik

Das Proteom umfasst die Gesamtheit der produzierten Proteine einer Zelle in Analogie zum Genom als der Gesamtheit des Erbguts (Wilkins *et al.*, 1997). Das Genom, die Gesamtheit der Gene, umfasst die vollständige Erbinformation einer Zelle bzw. eines Organismus und ist als solches statisch. Das Proteom repräsentiert dagegen einen bestimmten Zellzustand, der durch eine ganz charakteristische Mischung von Proteinen zu einem bestimmten Zeitpunkt gekennzeichnet ist. Proteome sind dynamisch, da sich ihre Zusammensetzung ständig im Laufe des Zellzyklus, des Lebens und auch in der Pathogenese eines Organismus ändert. Ein bekanntes Beispiel sind Raupe und Schmetterling, die bei gleichem Genom deutlich unterschiedliche Proteome aufweisen. Das Transkriptom, die Gesamtheit der transkribierten Gene, ist mit dem Proteom besser vergleichbar, da es ebenfalls den dynamischen Zustand einer Zelle widerspiegelt. Transkriptom und Proteom unterscheiden sich sehr in der Art der Informationen. Sie weisen nur geringe Korrelationen von mRNA- und Protein-Expressionsmustern (Anderson und Seilhamer, 1997) auf. Analysen auf der mRNA-Ebene geben nur unvollständig Auskunft über zelluläre Prozesse, da quantitative Änderungen der mRNA-Transkription zu 50 % mit der Proteinbildung korrelieren. Ein Gen kodiert oft für mehrere Proteine. Bei der Hefe gibt es zu jedem Gen im Durchschnitt drei verschiedene

Proteinprodukte. Das kann daran liegen, dass mehrere Proteine innerhalb eines Start- und Stoppsignals codiert sind oder dass aus einer exprimierten Proteinkette durch nachträgliche Spaltung mehrere funktionale Proteine entstehen. Viele Proteine weisen posttranslationale Modifikationen auf. Diese Veränderungen umfassen Prozessierungen des Proteins, wie das Anhängen von Zucker-, Lipid-, Phosphat- und Acetylgruppen. Durch diese Modifikationen wird häufig erst die biologische Aktivität erreicht oder drastisch verändert. Beim Menschen werden im Durchschnitt bis zu zehn unterscheidbare jeweils anders modifizierte Proteine pro Gen erwartet.

Die Darstellung des Proteoms oder Subproteoms erfolgt durch die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE), die erstmals 1975 beschrieben wurde (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Erst in der zweiten Hälfte der neunziger Jahre gelangte die 2D-GE durch technische Neuerungen und durch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Massenspektroskopie und der Bioinformatik zu wissenschaftlicher Signifikanz. Massenspektroskopie und Bioinformatik und der Datentransfer über das World Wide Web (WWW), ermöglichten die definierte Interpretation der Proteinmuster auf 2D-Gelen. Ein 2D- Gel kann Auskunft geben über Art, Ort, Modifikationen und relative Menge eines Proteins unabhängig vom Aktivitätszustand. Die Bioinformatik ist für die Proteomforschung und auch für die Transkriptom- und Genomforschung essentiell. Da in der Proteomanalytik sehr große Datenmengen erzeugt werden, ist eine computergestützte Bearbeitung und Verwaltung notwendig.

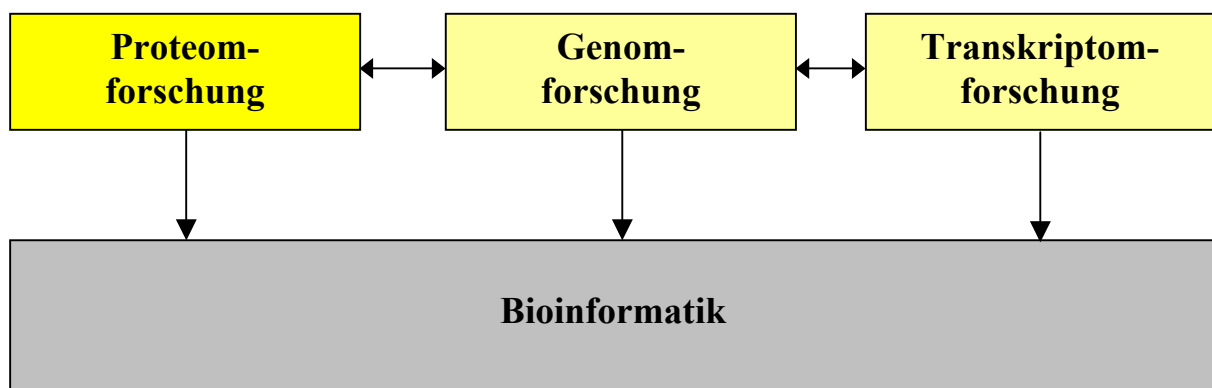


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Verknüpfung verschiedener Forschungsbereiche mit der Bioinformatik

2.8 Methoden der Proteomforschung

Voraussetzung für jede Proteomanalyse sind definierte und reproduzierbare Bedingungen für alle relevanten Parameter während der Probennahme, der Probenvorbereitung und der Durchführung der 2D-GE. Es muss sichergestellt werden, dass das Material reproduzierbar gewonnen werden kann, d.h. von Zellen gleicher Art, im gleichen Entwicklungsstatus und unter gleichen Bedingungen. Proteine sind Moleküle mit äußerst heterogenen biochemischen und physikalischen Eigenschaften. Die Darstellung in der 2D-GE erfasst daher nicht alle Proteine eines Proteoms. Fraktionierungen von Proteinproben vor der Elektrophorese reduzieren die Komplexität der Proben und erlauben die Darstellung von Proteinen, die nur in wenigen Dutzend Kopien pro Zelle vorkommen (Corthals *et al.*, 1997). Um komplexe Proteinmischungen in ihren Einzelkomponenten darzustellen, werden sie nach zwei komplementären Verfahren aufgetrennt. Proteine sind zwitterionische Moleküle und wandern im pH-Gradienten der ersten Dimension, der sogenannten isoelektrischen Fokussierung (IEF), zu dem Ort an dem ihre Nettoladung null ist. Die IEF ist eine Endpunktmethode. Die Entwicklung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) zur isoelektrischen Fokussierung der Proteine, ermöglichte ab Ende der achtziger Jahre auch laborübergreifend eine standardisierte Durchführung (Görg 1988) und löste die Verwendung von Träger-Ampholyten weitgehend ab (Fichmann 1999). Anschließend wird die Eigenladung der Proteine mit negativ geladenem SDS „maskiert“ und die Proteine in der zweiten Dimension aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Separierung erfolgt in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen, welche horizontal oder vertikal angeordnet sein können (Görg *et al.*, 1999; Walsh and Herbert, 1999). Die verwendete Technik zur Visualisierung der Proteine im 2-DE Gel hängt wiederum von der Aufgabenstellung ab. In der Proteomforschung wird als schnelle Identifikationsmethode der zweidimensional aufgetrennten Proteine der Peptidmassenfingerprint genutzt. Die Proteine werden durch eine spezifische Protease fragmentiert und die Peptidmassen mittels MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry - time of flight - mass spektroskopie) (Karas and Hillenkamp 1988; Hillenkamp and Karas 1990) oder des Elektrospray-Verfahrens (ESI-Q-TOF) bestimmt. Das Ergebnis ist ein charakteristisches Peptidfragmentmuster, nachdem in einer virtuell translatierten und prozessierten DNA-Bank gesucht wird. Für eine zuverlässige Identifikation und eine sinnvolle Zuordnung des jeweiligen Gens ist eine vollständige Genom-Datenbank des Organismus erforderlich. Des Weiteren sind die Suchalgorithmen und Software-Programme entscheidend für den Erfolg der Proteinidentifikation aus einer großen Datenmasse.

Die verfügbare Bildbearbeitungssoftware für 2D-Gele umfasst bislang keine vollautomatische Mustererkennung. Dies erfordert immer eine aufwendig Nacharbeitung von Hand. Demgegenüber arbeiten Programme zur Auswertung von Massenspektren relativ zuverlässig und automatisiert, so dass nur bei nicht eindeutigen Identifizierungen von Hand editiert werden muss. Daten aus lokalen Bildverarbeitungs- oder Massenspektroskopieprogrammen werden mit Datenbanken aus dem WWW ausgewertet und weiter verlinkt. Vernetzte Datenbanken sind für den heutigen wissenschaftlichen Betrieb unverzichtbar. Die Swiss-Prot Datenbank verfügt über Daten zu mehr als 80 000 Proteinen und ist direkt verbunden mit DNA- und Literatur-Datenbanken und Strukturvorhersageprogrammen. Umfassende Datenbanken können Fehlerquellen enthalten (Bork and Bairoch, 1996). In den Datenbanken treten häufig Annotationsprobleme auf. Zum Teil werden gleiche Abkürzungen für unterschiedliche Proteine oder Gene verwendet. Im Gegenzug werden oft verschiedene Namen für ein identisches Molekül benutzt, da keine einheitliche Nomenklatur vorgeschrieben ist. Die unterschiedlichen Annotationsweisen erschweren den Datenabgleich zwischen verschiedenen Datenbanken.

Mittlerweile wurde das Genom von vier verschiedener Pneumokokken-Stämme sequenziert. Die Genomdaten von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 sind in den Datenbanken von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) und ExPASy (www.expasy.ch) verfügbar. Für das 2,16 Mb große Genom von *S. pneumoniae* R6 wurden in silico 2043 ORFs (**o**pen **r**eadin**g** **f**rames) und für das 2,04 Mb Genom von *S. pneumoniae* Tigr4 2236 ORFs prognostiziert. Die Genomdaten von *S. pneumoniae* 23F und *S. pneumoniae* 670-6B sind noch nicht öffentlich zugänglich.

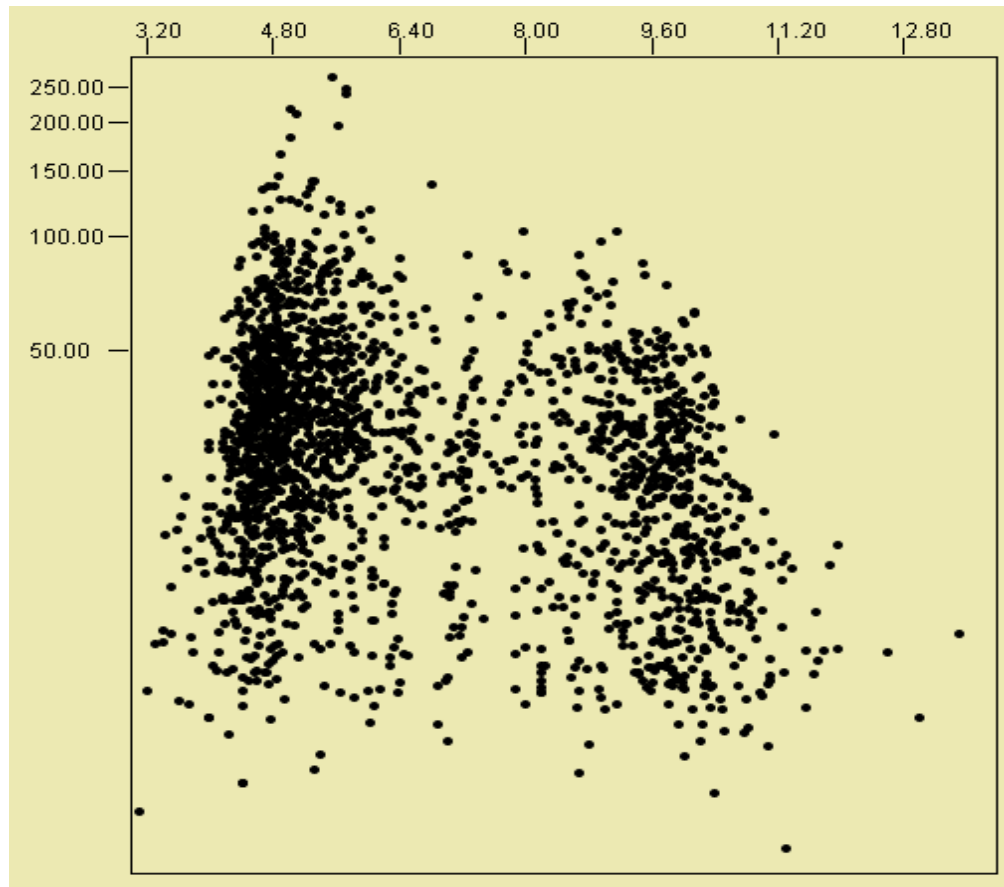


Abbildung 2.4: Theoretisches Proteom von *S. pneumoniae* R6 (erstellt mit JVirGel; www.jvirgel.de) (Hiller *et al*, 2003)

Die aufgrund der Genomdaten ermittelten theoretische Koordinaten der prognostizierten Proteine können in einem theoretischen 2D-Gel visuell dargestellt werden. Das theoretische Proteom kann Informationen über die generelle Verteilung der Proteine geben. Experimentell erstellte 2D-Gele geben dagegen Auskunft über real existierende Zustände und sind daher ein Werkzeug für die Untersuchung von Stoffwechseladaptionen, Stressantworten und Pathogenese von Mikroorganismen.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Proteom zeigt die aktuell produzierten Genprodukte zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Ziel dieser Arbeit war die Erstellung von 2D-Mastergelen des humanpathogenen Erregers *Streptococcus pneumoniae* D39. Die Mastergele sollten als Grundlage für vergleichende Proteomanalysen dienen. Der Vergleich von Expressionsprofilen von virulenten und nicht-virulenten Pneumokokken-Stämmen sollte Aufschluss über differentiell produzierte Proteine geben, die potentiell im Infektionsprozess involviert sind. Diese Proteine sollten anschließend durch biochemische und infektionsbiologische Untersuchungen charakterisiert werden. Die Etablierung von Proteinextraktion, Proteintrennung und Proteinfärbung für die zweidimensionale Gelelektrophorese von *S. pneumoniae* war dafür notwendig.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven

Das Proteom eines Mikroorganismus oder eines Gewebes ist immer nur eine Momentaufnahme der in der Zelle herrschenden Bedingungen, die sich im Verlauf der verschiedenen Wachstumsphasen ändern. Eine Reproduzierbarkeit und vergleichende Analyse ist nur möglich, wenn die Proben für eine Proteomanalyse immer unter den gleichbleibenden Bedingungen und damit auch aus einer identischen Wachstumsphase entnommen werden. In dieser Arbeit sollten Mastergele von dem *S. pneumoniae* Wildtyp-Stamm D39 (Serotyp 2) erstellt werden, die anschließend als Grundlage für eine vergleichende Proteomanalyse mit der isogenen *pavA*-Mutante D39 Δ *pavA* (PN28) dienen sollten. Idealerweise sollten sich die Bakterien demnach kollektiv in einer identischen Wachstumsphase unter definierten Bedingungen wie z.B. O₂-Gehalt und Temperatur befinden. In der exponentiellen Wachstumsphase, der log-Phase, haben die Bakterien ihre konstante minimale Generationszeit erreicht. Der Proteingehalt aller Bakterien der Kultur ist dabei weitgehend konstant. Daher wurden Bakterien aus dieser Wachstumsphase für die Proteomanalysen verwendet. Neben dem zytoplasmatischen und dem Membran-assoziierten Subproteom, sollte auch das Sekretom analysiert werden. Pneumokokken sind autolytisch, wenn sie eine bestimmte Zelldichte erreicht haben (Tomasz und Westphal, 1971) . Zur Vermeidung von zytoplasmatischen Verunreinigungen des Sekretoms durch Induktion der Autolyse wurden die Pneumokokken aus der frühen log-Phase für die Proteomanalyse verwendet. Es wurden zunächst Wachstumskurven der beiden für die Proteomanalyse verwendeten *S. pneumoniae* Stämme sowohl in Vollmedium (THY) als auch in chemisch definierten Medium (CDM) aufgenommen.

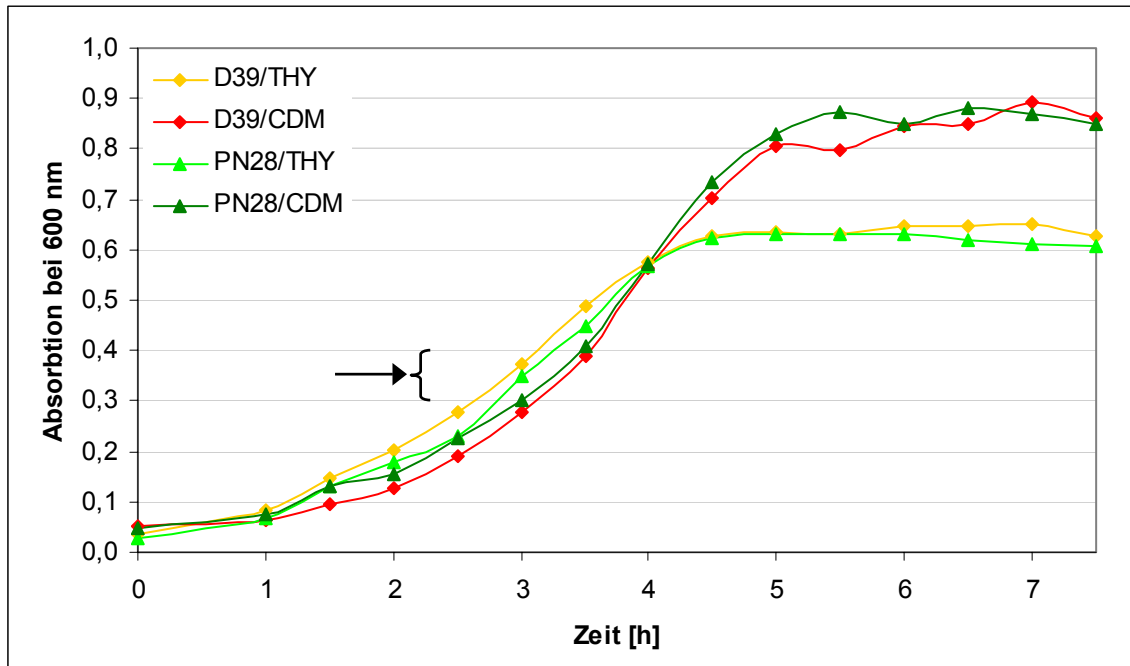


Abbildung 3.1: Wachstumskurven des *S. pneumoniae* Wildtyp-Stammes D39 und der isogenen *pavA*-Mutante D39 Δ *pavA* (PN28) in Vollmedium (THY) und chemisch definierten Medium (CDM). Die Probennahme für die Proteomanalyse erfolgte in dem markierten Bereich zwischen OD₆₀₀ 0,3 und 0,4.

Zu Beginn des Wachstums verhielten sich die Pneumokokken in CDM und THY-Medium identisch. Der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erfolgte nahezu zeitgleich. Bei der Kultivierung der Pneumokokken in CDM verlängerte sich allerdings die exponentielle Phase um ungefähr eine Stunde und es wurde eine höhere Zelldichte erreicht. Mit Beginn der stationäre Wachstumsphase wurde auch die Autolyse der Pneumokokken induziert. Die stationäre Wachstumsphase begann bei der Kultivierung der Pneumokokken in THY-Medium bei einer OD₆₀₀ von 0,6 und bei Kultivierung in CDM bei einer OD₆₀₀ von 0,8. Die Analyse der Wachstumsraten zeigte keine Unterschiede der isogenen *pavA*-Muante D39 Δ *pavA* (PN28) und dem *S. pneumoniae* Wildtyp-Stamm D39. Die Probennahme für die Proteomanalyse erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis maximal 0,4, da in diesem Bereich gewährleistet werden konnte, dass die Autolyse der Pneumokokken noch nicht eingesetzt hatte und sich die gesamte Kultur in der exponentielle Wachstumsphase befand.

3.2 Sensitivität des Farbstoffes RuBPS

Der Fluoreszenz-Farbstoff Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS), welcher nach dem Protokoll von Rabilloud (Rabilloud *et al.*, 2001; Rabilloud *et al.*, 2000; Berggren *et al.*, 2002) synthetisiert wurde, kann laut Literaturangaben Proteine bis zu 10 ng nachweisen. Zur Kontrolle der durchgeführten Farbstoff-Synthese wurde Rinderserumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen von 2000 ng bis 2 ng aufgetragen und mit dem Farbstoff visualisiert.

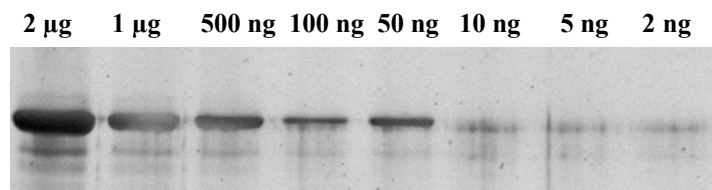


Abbildung 3.2: Sensitivitätstest für den Farbstoff RuBPS mit einer BSA-Verdünnungsreihe von 2 µg -2 ng.

Das verwendete BSA konnte bis zu einer Konzentration von 2 ng detektiert werden. Damit kam die Fluoreszenz-Färbung mit RuBPS zumindest für das Testprotein nahe an die Sensitivität einer Silberfärbung heran. Im Gegensatz zur Silberfärbung war die Proteinfärbung mit RuBPS allerdings quantitativ und in einem Bereich von 2-2000 ng Protein linear. Ein weiterer Vorteil dieser Färbemethode war die Reproduzierbarkeit. Da es sich um eine Endpunktfärbung handelte, war eine "Überfärbung" nicht möglich. Die Färbemethode mit RuBPS war einfach, günstig und kompatibel mit massenspektroskopischen Analysen. Die Färbung der 2D-Gele wurde daher hauptsächlich mit dem Farbstoff RuBPS durchgeführt.

3.3 Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese für das Proteom von *S. pneumoniae*

Das Proteom gewährt Einblicke in die aktuelle Zusammensetzung der Proteine, also das aktuelle Geschehen in einer Zelle. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) ist neben der Massenspektroskopie die grundlegende Methode bei der Proteomanalyse. Mit Hilfe der 2D-GE können komplexe Proteinproben aufgetrennt werden (Görg *et al.*, 2000). Die Identifikation der Proteine erfolgte anschließend mittels Massenspektroskopie. Grundvoraussetzung dafür ist eine auf das verwendete Material optimierte 2D-GE. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 2D-GE für die Proteomanalyse des Mikroorganismus *S. pneumoniae* etabliert. Hierbei wurden zunächst optimierte Methoden für die

Proteinextraktion, Proteintrennung und die Proteinfärbung erarbeitet. Die Etablierung und Optimierung dieser Methoden nahm einen erheblichen zeitlichen Anteil dieser Arbeit in Anspruch. Im Detail wird nur auf die Optimierung der Proteinextraktion eingegangen, da diese von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Proteomanalyse von *S. pneumoniae* war. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteinfärbungen waren die Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff Ruthenium-II-bathophenanthrolin-disulfonat (RuBPS) und die Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie. Die verwendeten Parameter der Proteintrennung sind in Abschnitt 5.2.5 aufgeführt (Görg *et al.*, 1991; Strahler *et al.*, 1988).

3.3.1 Optimierung der Proteinextraktion

Bei der Proteomanalyse sollten nach Möglichkeit sämtliche Proteine der Zellen erfasst werden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese basiert auf der Auftrennung von Proteinen in einem wässrigen System. Proteine besitzen ein stark divergierendes Löslichkeitsverhalten basierend auf ihrer Aminosäuresequenz und ihrer dreidimensionalen Struktur. Viele Proteine enthalten dabei mehr oder weniger stark ausgeprägte hydrophobe Bereiche, die die Löslichkeit im wässrigen System erschweren. Durch Zusatz von chaotropen Substanzen (Fountoulakis und Takacs, 2001) und Detergenzien (Vuillard *et al.*, 1995; Helenius *et al.*, 1979) kann die Löslichkeit vieler Proteine in wässriger Lösung erhöht werden. Die Anreicherung aller in der Zelle vorkommenden Proteine unter ein und derselben Bedingung ist dennoch nicht möglich. Daher wurden die Extraktionsbedingungen auf die jeweilige Proteingruppen abgestimmt, damit eine größtmögliche Anzahl von Proteinen erfasst werden konnte. Die zytoplasmatischen Proteine, welche eine geringe Hydrophobizität besaßen, waren die erste Zielgruppe (Herbert, 1999; Harder *et al.*, 1999; Cull und McHenry, 1990; Hochstrasser *et al.*, 1988). Die zweite Zielgruppe stellten die Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine dar (Rabilloud, 1998; Thomas und McNamee, 1990; Santoni *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 2000; Pasquali *et al.*, 1997; Chevallet *et al.*, 1998). Diese enthielten einige hydrophobe Bereiche, welche die Löslichkeit im wässrigen System herabsetzten und den Zusatz von chaotropen Substanzen und Detergenzien nötig machten. Die verwendeten Extraktionspuffer konnten aufgrund ihrer Zusammensetzung direkt in der 2D-GE eingesetzt werden, sind also identisch mit dem Begriff Rehydrierungspuffer. Im Rahmen der Optimierung wurden verschiedenen Zusammensetzungen der Extraktionspuffer getestet. Dabei wurden sowohl die Konzentrationen der chaotropen Substanzen variiert als auch verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen von Detergenzien erprobt. Die verwendeten chaotropen Substanzen waren Harnstoff und Thioharnstoff. Die geprüften

Detergenzien waren Triton X-100 (Sigma), CHAPS (Applichem), ASB-14 (Calbiochem), SB 3-10 (Sigma), C8 ϕ (Calbiochem) und Dodecyl- β -D-maltosid (Applichem). Die am Ende verwendeten Extraktionsbedingungen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

3.3.1.1 Präzipitationsbasierte Proteinextraktion

3.3.1.1.1 Eignung verschiedener Proteinpräzipitationen für die Proteomanalyse

Nach dem Aufschluss der Bakterien und der Sedimentation der unlöslichen Zellwandtrümmer lagen die zytoplasmatischen Proteine zusammen mit den restlichen löslichen Zellbestandteilen, wie Nukleinsäuren, Polysacchariden, Lipiden und Salzen in einer Lösung vor. Diese Bestandteile haben eine negative Wirkung auf die isoelektrische Fokussierung. Daher erfolgte die Trennung der Proteine von diesen Molekülen durch eine selektive Proteinpräzipitation. Die Eignung von vier verschiedenen Proteinfällungen wurde für die Proteomanalyse untersucht. Zwei der untersuchten Proteinpräzipitationen basierten auf der Fällung mit organischem Lösungsmittel. Das organische Lösungsmittel interferierte nach der Zugabe zum Proteinextrakt mit der Solvatisierung der Proteine, indem es mit den Proteinen um das Hydratationswasser konkurrierte. Als Folge dessen vermehrten sich die Protein-Protein-Kontakte, die über eine Aggregation zur Präzipitation der Proteine führten. Es wurden die organischen Lösungsmittel Phenol und Aceton verwendet. Dasselbe Prinzip führte zur Präzipitation der Proteine bei der Fällung über die Ionenstärke mit Ammoniumsulfat. Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) ist eine weit verbreitete und sehr effektive Präzipitationsmethode, die ebenfalls auf den Entzug des Solvatisierungswassers der Proteine beruht. Die TCA war in Aceton gelöst, daher handelte sich in diesem Fall um eine kombinierte Fällungsmethode. Mit Ausnahme der Ammoniumsulfat-Fällung handelt es sich bei den untersuchten Präzipitationen um denaturierende Methoden. Als Folge der Denaturierung kann es zu einer verschlechterten Resolubilisierbarkeit mancher Proteine kommen. Eine denaturierende Proteinfällung führte daher auch zu Proteinverlusten.

Für die Untersuchung der Proteinpräzipitationen wurden Proteinextrakte von *S. pneumoniae* D39 verwendet. Für die Resolubilisierung der Proteinpräzipitate wurde der Rehydrierungspuffer R1 verwendet. Die isoelektrische Fokussierung der Proteinextrakte erfolgte in einem pH-Gradienten von 3-10. Die anschließende SDS-PAGE wurde in 12 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt.

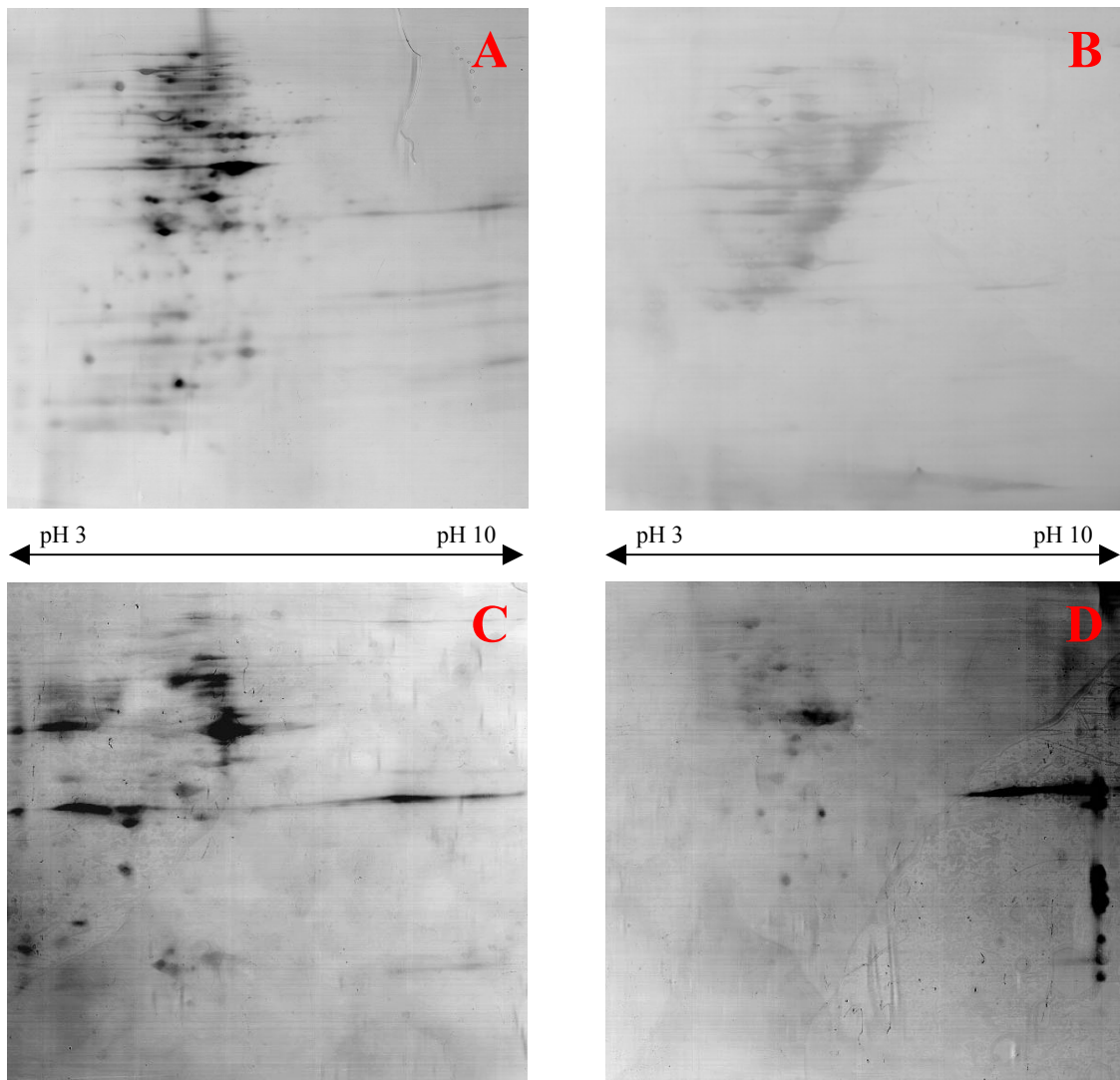


Abbildung 3.3: Expressionsmuster der zytoplasmatischen Proteine von *S. pneumoniae* D39 im pH Bereich von 3-10 nach der selektiven Fällung der Proteine mit TCA/Aceton (A), Ammoniumsulfat (B), Aceton (C) und Phenol (D). Die Proteine wurden durch eine Silberfärbung visualisiert. Die Analyse erfolgte mit je 200 µg Proteinextrakt.

Die Expressionsprofile der Präzipitationen mit Ammoniumsulfat und Aceton zeigten nur wenige deutlich separierte Proteine und waren dominiert von horizontalen Proteinstreifen (Abb. 3.3 B und C). Die Phenol-Fällung wies im Expressionsprofil zwar klar separierte Proteinspots auf, aber nur in geringer Anzahl (Abb. 3.3 D). Die kombinierte TCA/Aceton-Präzipitation erwies sich als die geeignetste Methode für die Proteomanalyse, da im Expressionsprofil eine große Anzahl distinkter Proteinspots detektiert werden konnten (Abb. 3.3 A).

Die meisten Proteine konzentrierten sich bei der isoelektrischen Fokussierung in einem kleinen pH-Bereich. Die Auflösung der Expressionsprofile wurde daher im pH-Bereich in den

nachfolgenden Experimenten erhöht, indem die Proteine im pH-Bereich von 4-7 fokussiert wurden.

3.3.1.1.2 TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion

Die präzipitationsbasierte Proteinextraktion ist eine zweistufige Methode. Im ersten Schritt wurden, nach dem Aufschluss der Zellen, alle Proteine mittels der TCA/Aceton-Lösung ausgefällt und durch Zentrifugation sedimentiert. Das Proteinpräzipitat wurde anschließend resolubilisiert. Dieser Proteinextrakt enthielt die Proteine des zytoplasmatischen Subproteoms (zyP). Der zweite Schritt umfasste neben der Proteinpräzipitation eine Proteinextraktion. Das nach dem Zellaufschluss abgetrennte Sediment bestand zum Großteil aus Zellwand- und Membrantrümmern. Viele Proteine waren darin integriert oder an deren Oberfläche assoziiert. Die Extraktion der assoziierten Proteine erfolgte mit dem Detergenz CHAPS. Die Aufreinigung und Konzentration der Proteine erfolgte über die TCA/Aceton-Präzipitation. Der entstandene Proteinextrakt nach der Lösung des Proteinpräzipitats enthielt die Proteine des Membran- und Zellwand-assoziierten Subproteoms (mpa). In Abbildung 3.4 sind Expressionsprofile dargestellt, die mit Proteinextrakten aus der TCA/Aceton-präzipitationsbasierten Extraktion hergestellt wurden.

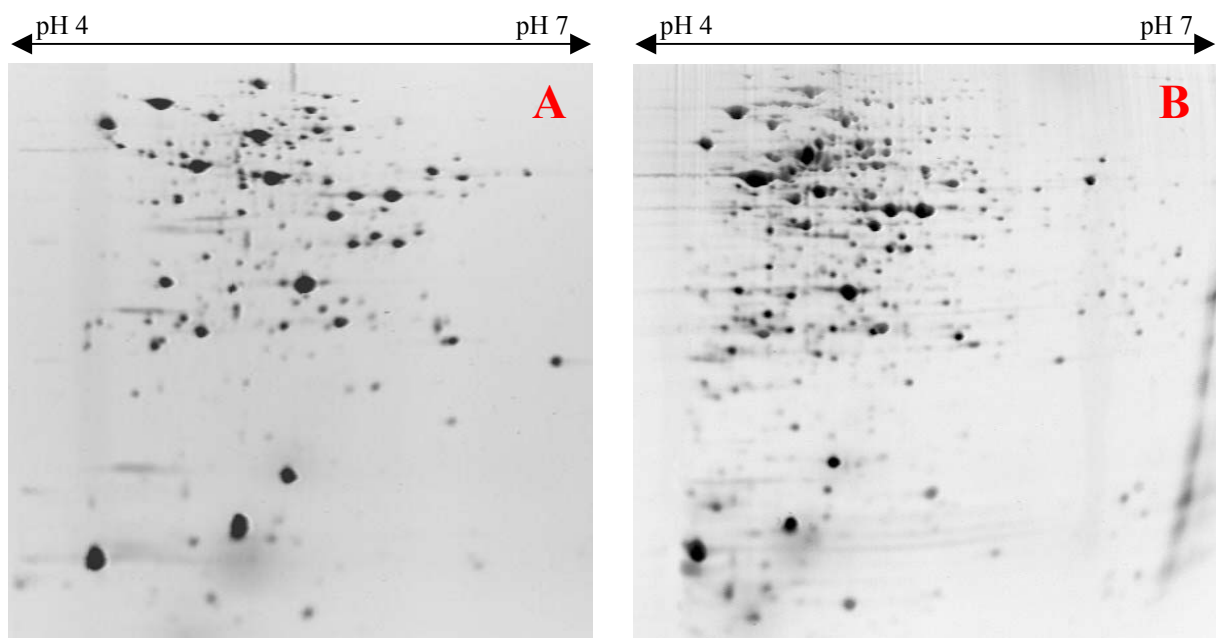


Abbildung 3.4: Expressionsprofile der TCA/Aceton-präzipitationsbasierten Proteinextrakte vom Subproteom der zytoplasmatischen Proteine zyP (A) und vom Subproteom der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine mpa (B) von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7. Für die Analyse wurden je 150 µg Proteinextrakt verwendet. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit dem Farbstoff RuBPS.

Mittels der halbautomatischen Auswertung der Expressionsprofile mit dem 2D-GE-Analyse-Programm Phoretix von "Nonlinear dynamics" konnten im zytoplasmatischen Subproteom 279 Proteinspots detektiert werden. Im Expressionsprofil des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms wurden sogar 390 Proteinspots detektiert. Auffällig war, dass die meisten verstärkt auftretenden Proteine sowohl im Subproteom zyP als auch im Subproteom mpa vorlagen. Die Separierung der Proteine in den Expressionsprofilen ist zufriedenstellend.

3.3.1.2 Fraktionierte Proteinextraktion

Die fraktionierte Proteinextraktion ähnelt im Ablauf der präzipitationsbasierten Extraktion. Bei dieser Methode wurde allerdings auf eine Proteinfällung zur Aufreinigung und Konzentration der Proteine verzichtet. Durch den Verzicht auf die Proteinpräzipitation wurden Proteinverluste vermieden. Durch die fehlende Aufreinigung wurden allerdings viele Störfaktoren der isoelektrischen Fokussierung nicht beseitigt. Nach dem Zellaufschluss der Pneumokokken in niedrigmolaren Tris-Puffer und der Abtrennung der Zelltrümmer wurde der klare Überstand, der die löslichen zytoplasmatischen Proteine enthielt, in der 2D-GE analysiert. Das resultierende Expressionsprofil konnte aufgrund starker horizontaler Streifenbildung nicht ausgewertet werden. Daher wurden zur Eliminierung der Nukleinsäuren aus dem Proteinextrakt ein DNase- und RNase-Verdau durchgeführt und die Proteine des zytoplasmatischen Subproteoms (ZP) anschließend in der 2D-GE aufgetrennt.

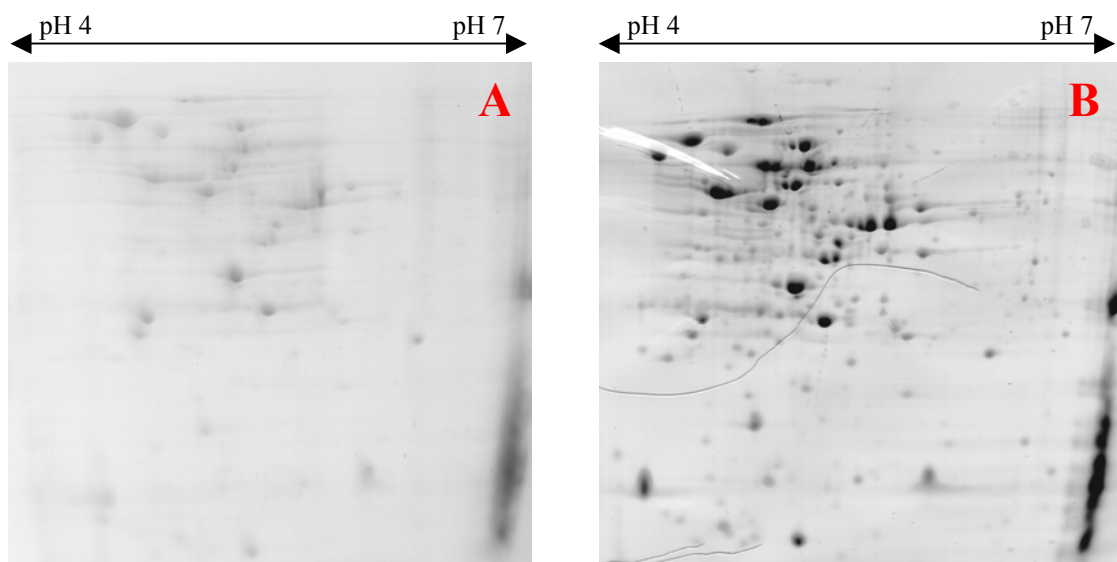


Abbildung 3.5: Expressionsprofile des zytoplasmatischen Subproteoms (ZP) der fraktionierten Proteinextraktion von *S. pneumoniae* D39 vor (A) und nach (B) einem Nukleinsäure-Verdau. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im pH-Bereich 4-7. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbung visualisiert. Es wurde je 300 µg Proteinextrakt aufgetrennt.

Das Expressionsprofil des zytoplasmatischen Subproteoms (ZP) nach dem Nukleinsäureverdau zeigte eine gute Proteinauftrennung mit vielen distinkt auftretenden Spots (Abb. 3.5). Eine horizontale Streifenbildung war nur noch im geringen Maß vorhanden. Die beim Zellaufschluss freigesetzten Nukleinsäuren stellten demnach den größten Störfaktor in der isoelektrischen Fokussierung dar. Die Zersetzung der RNA und DNA war ausreichend für den Erhalt auswertbarer Expressionsprofile des Subproteoms ZP.

Die Extraktion der Proteine aus dem Zelltrümmersediment erfolgte mit dem Rehydrierungspuffer R3. Dieser konnte direkt zur Auftrennung in der 2D-GE eingesetzt werden. Das resultierende Expressionsprofil zeigte die Proteine des Subproteoms der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine (MP1). Das abgetrennte und zum Teil extrahierte Zelltrümmersediment wurde anschließend in SDS-haltigen Puffer resuspendiert und stark hitzebehandelt, um weitere Proteine zu extrahieren bzw. in Lösung zu bringen. Dieses Subproteom (MP2) sollte schwer lösliche Proteine enthalten. Eine isoelektrische Fokussierung war aufgrund der Präsenz des Detergenzes SDS nicht möglich. Die Auftrennung der Proteine erfolgte ausschließlich nach Molekulargewicht.

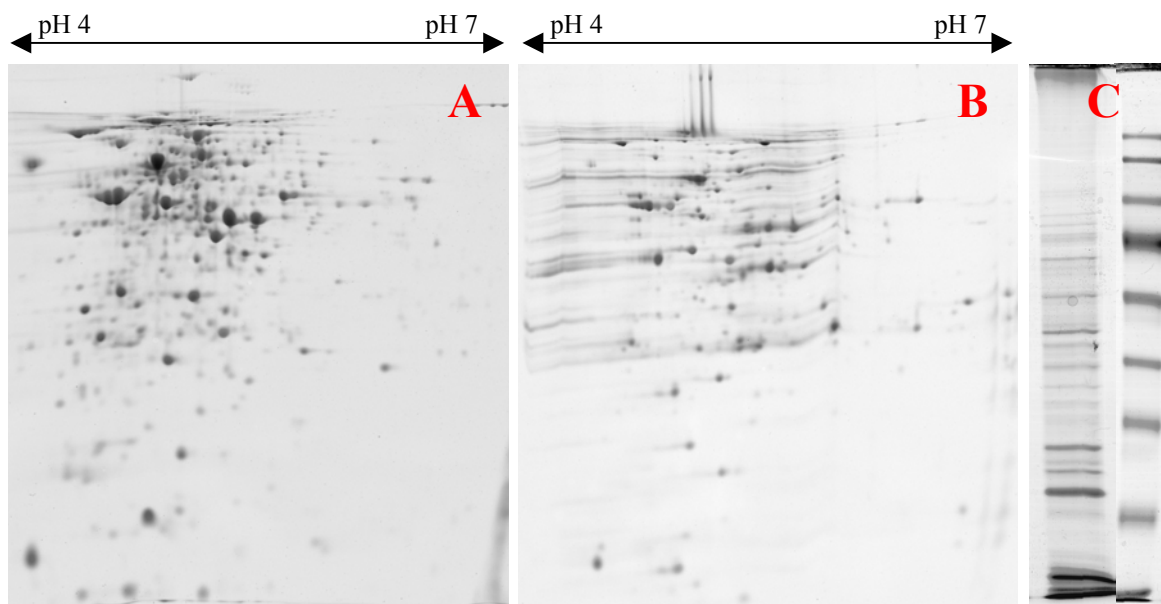


Abbildung 3.6: Expressionsprofile der fraktionierten Probenextraktion des zytoplasmatischen Subproteoms ZP (A) und des Subproteoms der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine MP1 (B) aufgetrennt im pH-Bereich von 4-7 und mit dem Farbstoff RuBPS visualisiert. Es wurde jeweils 150 µg Protein aufgetragen. Bild C zeigt das eindimensional aufgetrennte Subproteom MP2. Die Visualisierung erfolgte mit kolloidalem Coomassie. Es wurde 25 µg Proteinextrakt aufgetrennt.

Im Expressionsprofil des Subproteoms ZP konnten 412 Proteinspots (Abb. 3.6 A) und im Expressionsprofil des Subproteoms MP1 konnten 274 Proteinspots (Abb. 3.6 B) mit der halbautomatischen Auswertung von Phoretix detektiert werden. Die visuelle Auswertung des eindimensionalen Subproteoms MP2 ergab 29 detektierbare Banden (Abb. 3.6 C). Die Expressionsprofile des Subproteoms MP1 zeigten neben distinkt auftretenden Spots immer eine ausgeprägte horizontale Streifenbildung. Dies war ein Zeichen für eine Störung in der isoelektrischen Fokussierung. Der verwendete *S. pneumoniae* D39 ist umgeben von einer polysaccharidhaltigen Kapsel. Beim Serotyp 2 sind die Kapselpolysaccharide kovalent an die Außenseite des Zellwand-Peptidoglycans der Pneumokokken gebunden (Sorensen, 1990). Durch die Behandlung der Zelltrümmer mit den extrahierenden Chemikalien wurden diese kovalenten Bindungen wahrscheinlich teilweise zerstört und die Kapselpolysaccharide in den Proteinextrakt freigesetzt. Die Gelmatrix der IPG-Streifen wurde dann zum Teil durch diese Makromoleküle zugesetzt und damit eine vollständige Fokussierung der Proteine verhindert.

3.3.2 Vergleich der untersuchten Proteinextraktionen für die Eignung in der vergleichende Proteomanalyse

Mit der TCA/Aceton-präzipitationsbasierten Proteinextraktion konnten bei einer Aufteilung in zwei Subproteome insgesamt 669 Proteinspots bei *S. pneumoniae* separiert werden. Mit der fraktionierten Proteinextraktion konnten bei einer Aufteilung in drei Subproteome insgesamt 715 Proteinspots detektiert werden. Dabei wurden nur Proteinspots erfasst, die reproduzierbar in jeweils drei unabhängig voneinander erstellten Expressionsprofilen auftraten. Mit der fraktionierten Proteinextraktion konnten demnach insgesamt nur 46 Proteine mehr erfasst werden. Das Ziel dieser Arbeit war allerdings nicht nur die Erstellung von Mastergelen von *S. pneumoniae*, sondern auch die vergleichende Proteomanalyse zwischen dem virulenten *S. pneumoniae* Wildtyp-Stamm D39 und dessen isogener *pavA*-Mutante PN28, die im Sepsis-Modell der Maus substantiell attenuiert war. Die Expressionsprofile von *S. pneumoniae* D39 bei der präzipitationsbasierten Proteinextraktion zeigten zwar deutlichere Trennungsmuster, insbesondere beim Vergleich der Subproteome mpa (390 Proteinspots) und MP1 (274 Proteinspots), aber beim Vergleich der Expressionsprofile von *S. pneumoniae* D39 und dessen isogener *pavA*-Mutante PN28 konnten keine unterschiedlich regulierten Proteine identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte im Vergleich der Expressionsprofile der fraktionierten Proteinextraktion von *S. pneumoniae* D39 und dessen isogener *pavA*-Mutante PN28 im Subproteom MP1 zwei reproduzierbare Unterschiede im Spotmuster festgestellt

werden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse wurde für die Erstellung der Mastergele und die darauf basierende vergleichende Proteomanalyse die fraktionierte Proteinextraktion ausgewählt.

3.4 Erstellung von Mastergelen für das Proteom von *S. pneumoniae* D39

Als Grundlage für die vergleichende Proteomanalyse von *S. pneumoniae* wurden Mastergele vom *S. pneumoniae* D39 erstellt. Dazu wurden die nach der Durchführung der 2D-GE aufgetrennten Proteine aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurden die Proteine mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide aus der Gelmatrix eluiert. Das Molekulargewicht der Peptide wurde dann mittels MALDI-TOF-MS bestimmt. Es entstand für jedes Protein ein spezifischer Peptidmassenfingerabdruck. Durch den Vergleich der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den Massen einer virtuell verdauten Datenbank von *S. pneumoniae* konnten die Proteine identifiziert werden. Die genaue Sequenz einzelner Peptide konnte mit dem MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer analysiert werden. Diese Zusatzinformation erhöhte die Genauigkeit der Identifizierung der Proteine.

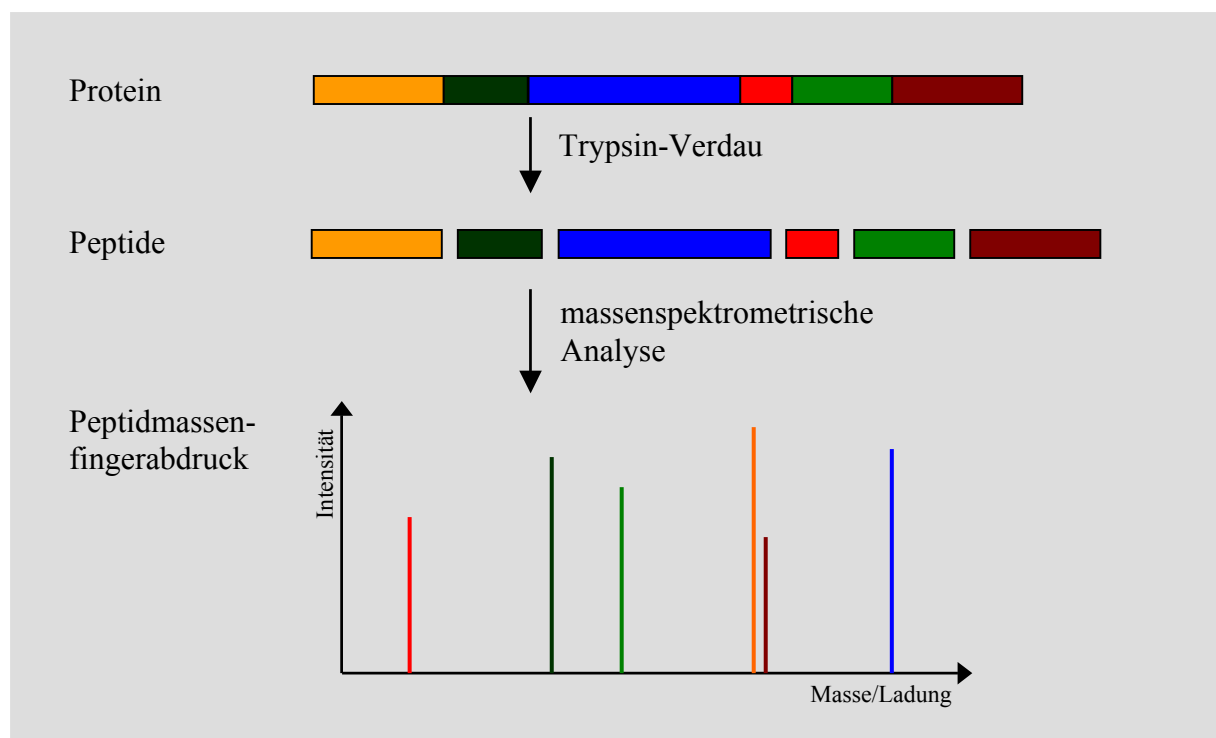


Abbildung 3.7 : Prinzip des Peptidmassenfingerabdrucks

Voraussetzung für die Verwendung der MALDI-TOF-MS war das vollständig sequenzierte und annotierte Genom des entsprechenden Organismus. Bisher ist das Genom von vier verschiedenen *Streptococcus pneumoniae* Stämmen bekannt: *S. pneumoniae* TIGR4, *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* 23F und *S. pneumoniae* 670-6B. In dieser Arbeit wurden

für die identifizierten Proteine vorzugsweise die Annotierungen von *S. pneumoniae* R6 verwendet. *S. pneumoniae* R6 ist ein Laborstamm der auf *S. pneumoniae* D39 zurückzuführen ist und dem im Gegensatz zu *S. pneumoniae* D39 die Gene für die Kapselpolysaccharidsynthese fehlen [Hoskins *et al*, 2001]. Die automatische Datenbanksuche erfolgte mit dem Programm Biotools von Bruker. Die verwendete Datenbank stammte vom NCBI-Server (www.ncbi.nlm.nih.gov) und der verwendete Suchalgorithmus war vom Matrixscience-Server Mascot (www.matrixscience.de). In Abbildung 3.8 ist das Ergebnis einer erfolgreichen Identifizierung am Beispiel der Zink-Metalloprotease ZmpB dargestellt.

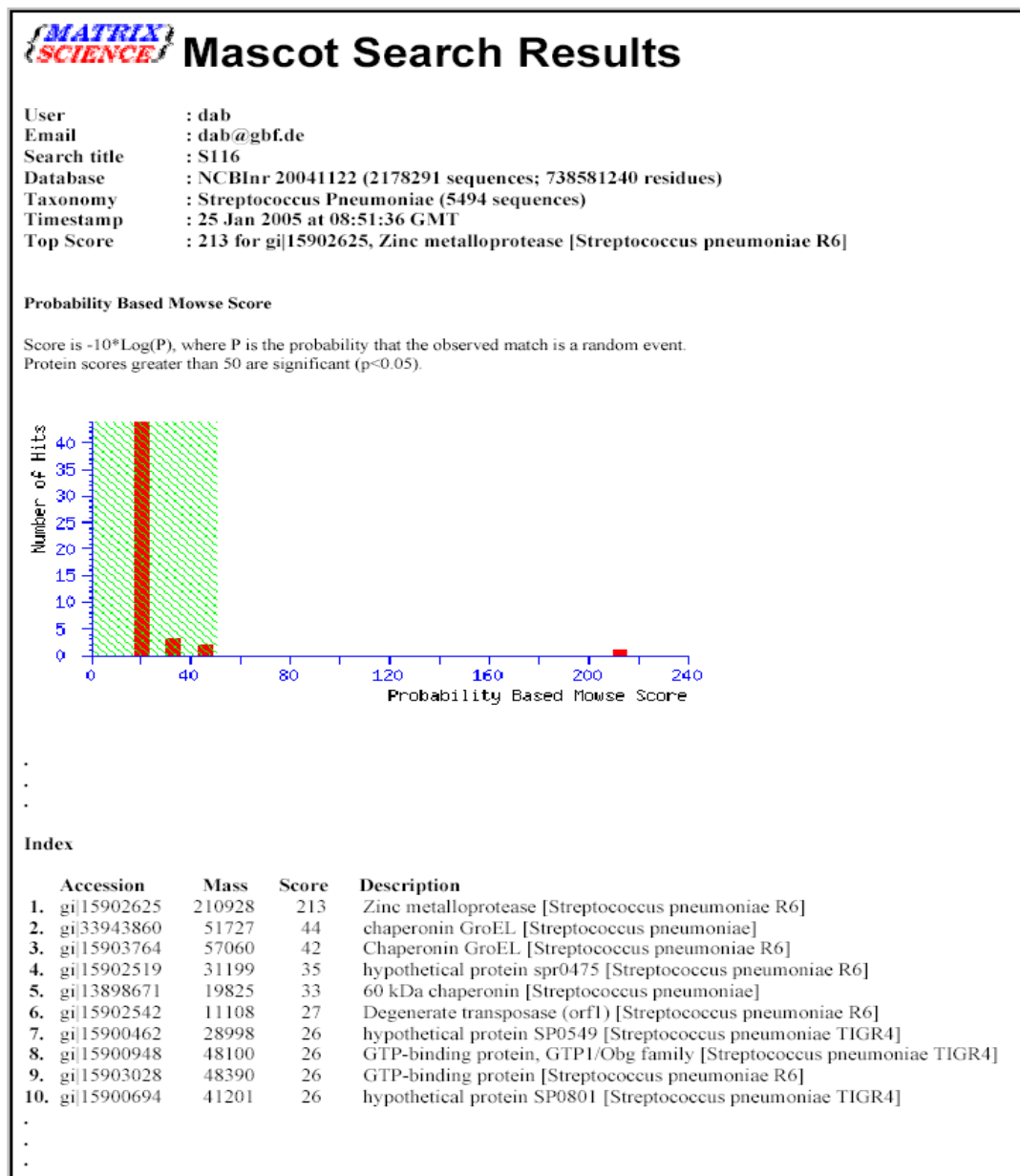


Abbildung 3.8: Auszug einer Peptidmassensuche über Mascot (www.matrixscience.de) mit graphischer und tabellarischer Angabe der Suchergebnisse

Bei der Identifizierung ist der Score das Maß der statistischen Signifikanz. Eine Identifikation mit einem Score unter 50 ist nicht signifikant, da die Wahrscheinlichkeit eines Zufalltreffers bei mehr als 5 % liegt. Je höher der Score desto sicherer ist die Identifizierung. Neben dem Score wurde auch der prozentuale Anteil der detektierten Sequenz bei der Identifizierung berücksichtigt, denn es werden selten alle Peptide eines Proteins mit der MALDI-TOF-MS erfasst. Zudem wurde die Lage jedes Proteins im Expressionsprofil mit den theoretisch errechneten pI und Molekulargewicht abgeglichen. Die Verteilung der gefunden Peptide über die Proteinsequenz konnte dabei Aufschluss geben, ob es sich um das gesamte oder nur ein Fragment des Proteins handelte.

Eine große Anzahl Proteine wurde ausgeschnitten und identifiziert und damit umfassende Informationen über die Präsenz der aus der Genomsequenz vorhergesagten Proteine bereitgestellt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt und beziehen sich auf die Proteinexpression der Pneumokokken während der exponentiellen Wachstumsphase bei aerober Kultivierung in CDM bei 37°C.

3.4.1 Sekretom-Analyse von *S. pneumoniae* D39

Das Sekretom der Pneumokokken war von besonderem Interesse, da diese Proteine in direkten Kontakt mit Wirtsproteinen, den Komponenten des Immunsystems oder auch den Zellen des Wirtes treten können. Damit können die Proteine des Sekretoms unter Umständen auch potenziell wichtige Erreger-Wirt-Interaktionen vermitteln .

Die sekretierten Proteine wurden aus Kulturen des Stammes *S. pneumoniae* D39, die in CDM bis zu einer $OD_{600} \sim 0,3$ kultiviert wurden, isoliert. Die schon in Abschnitt 3.1 angesprochene Problematik der Autolyse bei Pneumokokken verhinderte die Kultivierung einer großen Menge Biomasse und dementsprechend auch die Isolierung großer Mengen an sekretierten Proteinen. Für die Erstellung eines Expressionsprofils des Sekretoms wurden die sekretierten Proteine aus 900 ml Kulturüberstand isoliert. Aufgrund der geringen Konzentration der Proteine im Kulturüberstand wurde eine TCA/Aceton-Präzipitation zur Konzentration der sekretierten Proteine durchgeführt.

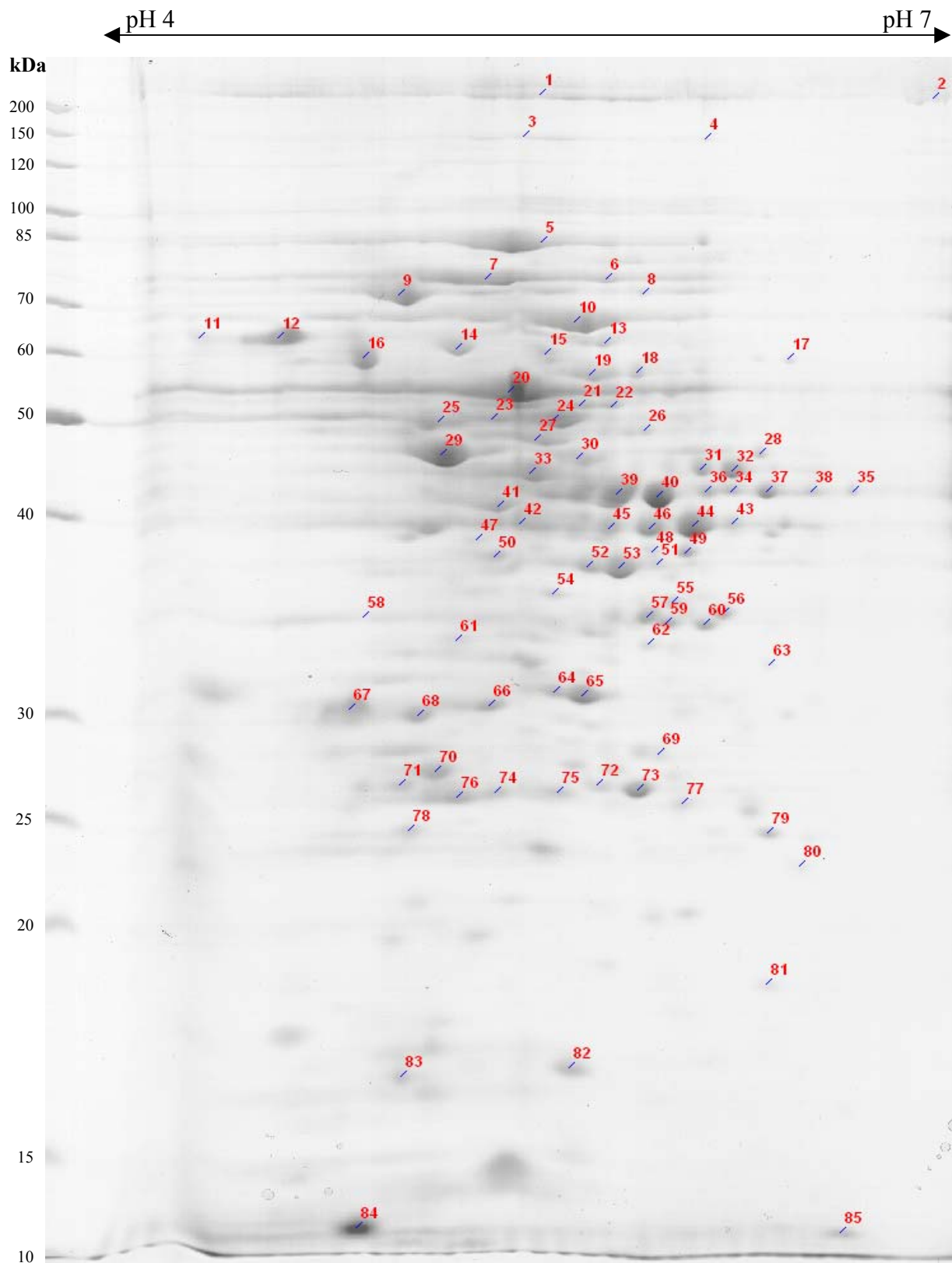


Abbildung 3.9: Sekretom von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7 auf einem 11 cm IPG-Strip (Biorad) aufgetrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit kolloidalem Coomassie. Die aufgetragene Menge Protein entsprach den sekretierten Proteinen aus einer 900 ml Kultur, die in CDM bis zu einer $OD_{600} \sim 0,3$ kultiviert wurde. Die mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine sind nummeriert und in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1 : Identifizierte Proteine des Sekretoms von *S. pneumoniae* D39 mit Angabe der Lage der Proteinspots durch Nummerierung in Abbildung 3.9. Die Proteine wurden auf das Vorkommen eines Signalpeptids (SP) hin analysiert.

Spot	Gen/ Genlokus	Funktion	SP	COG
1+2	zmpB / spr0581	Zinc metalloprotease	Ja	-
3+4	rpoB / spr1777	DNA-dependent RNA polymerase subunit beta	Nein	K
5	fusA / spr0250	Elongation factor G	Nein	J
6	tktA / spr1841	Transketolase	Nein	G
7	aliA / spr0327	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	Ja	E
8	manL / spr0261	Phosphotransferase system, mannose-specific EIIAB	Nein	G
9	Dank / spr0455	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)	Nein	O
10	spxB / spr0642	Pyruvate oxidase	Nein	E
11+12	- / spr1875	hypothetical protein spr1875	Ja	-
13	ilvD / spr1935	Dihydroxyacid dehydratase	Nein	E
14	groEL / spr1722	Chaperonin GroEL	Nein	O
15	- / spr0775	hypothetical protein spr0775	Nein	O
16	tig / spr0362	Trigger factor	Nein	O
17	- / spr0309	hypothetical protein spr0309	Nein	S
18+19	pykF / spr0797	Pyruvate kinase I; fructose-stimulated	Nein	G
20	tuf / spr1343	Translation elongation factor TU	Nein	J
21+22	metK / spr0671	S-adenosylmethionine synthetase	Nein	H
23	- / spr0772	hypothetical protein spr0772	Nein	O
24	rpsA / spr0764	30S Ribosomal protein S1	Nein	J
25	ftsZ / spr1510	Cell division protein FtsZ	Nein	D
26	recA / spr1757	DNA recombination/repair	Nein	L
27	nox / spr1323	NADH oxidase	Nein	R
28	purA / spr0021	Adenylosuccinate synthetase	Nein	F
29	eno / spr1036	Enolase	Nein	G
30	glyA / spr0928	Serine hydroxymethyltransferase	Nein	E
31+32	gdhA / spr1181	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Nein	E
33	pgk / spr0441	Phosphoglycerate kinase	Nein	G
34+37	fabF / spr0382	Beta ketoacyl-acyl carrier protein synthase	Nein	I
35+38	lctO / spr0627	Lactate oxidase	Nein	C
36+39+40	gsp-781 / spr2021	General stress protein GSP-781	Ja	R
41	tsf / spr2019	Elongation factor TS	Nein	J
42	ilvC / spr0403	Ketol-acid reductoisomerase	Nein	E
43-46	gapA / spr1825	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	Nein	G
47	dapA / spr0919	Dihydrodipicolinate synthase	Nein	E
48+49	cpsN / spr0322	dTDP-glucose-4,6-dehydratase	Nein	M
50	galE / spr1460	UDP-glucose 4-epimerase	Nein	M
51-53	ldh / spr1100	L-lactate dehydrogenase	Nein	C

Spot	Gen/ Genlokus	Funktion	SP	COG
54	ilvE / pr0758	Branched-chain-amino-acid transaminase	Nein	E
55	galU / spr1903	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Nein	M
56	fabK / spr0379	Enoyl-acyl carrier protein(ACP) reductase.	Nein	R
57-59	rpsB / spr2020	30S Ribosomal protein S2	Nein	J
60	pfA / spr0796	6-phosphofructokinase I	Nein	G
61	fabD / spr0380	Malonyl acyl carrier protein transacylase	Nein	I
62	sphtra / spr2045	Serine protease	Ja	J
63	- / spr1994	hypothetical protein spr1994	Nein	O
64+65	fba / spr0530	Fructose-bisphosphate aldolase	Nein	G
66	cps2L / spr0320	The type 2 capsule locus of Streptococcus pneumoniae	Nein	M
67	ABC-SBP / spr0146	ABC transporter substrate-binding protein - amino acid transport	Ja	E
68	nagB / spr1272	N-acetylglucosamine-6-phosphate isomerase	Nein	G
69	pyrH / spr0845	UMP kinase	Nein	F
70	ABC-NBD / spr0771	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	Nein	O
71	- / spr1625	hypothetical protein spr1625	Nein	-
72+73	gpmA / spr1499	Phosphoglyceromutase	Nein	G
74	efp / spr0392	Elongation factor P	Nein	J
75	adk / spr0210	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	Nein	F
76	tpiA / spr1432	Triose phosphate isomerase	Nein	G
77	pcp1 / spr0762	Pyrrolidone-carboxylate peptidase (5-oxopropyl-peptidase)	Nein	O
78	grpE / spr0454	Heat-shock protein (activation of DnaK)	Nein	O
79	upp / spr0655	Uracil phosphoribosyltransferase	Nein	F
80	frr / spr0846	Ribosome recycling factor	Nein	J
81	ssb / spr1395	Single stranded binding protein	Nein	-
82	rplJ / spr1212	50S Ribosomal protein L10	Nein	J
83	dpr / spr140	DNA binding protein starved cells-like peroxide resistance protein	Nein	P
84	rplL / spr1211	50S Ribosomal protein L12	Nein	J
85	bta / spr1352	Bacterocin transport accessory protein	Nein	-

Im Expressionsprofil vom Mastergel des Sekretoms wurden 140 Proteinspots detektiert. Es wurden insgesamt 289 Proteine aus drei unabhängigen 2D-Gelen ausgeschnitten und analysiert. Von den analysierten Proteinen konnten 160 identifiziert werden, darunter befanden sich 65 verschiedene Proteine. Das Proteom kann neben den reinen Proteindaten auch Informationen über deren Modifikationen geben. So waren einige Proteine nicht nur durch einen Spot im Expressionsprofil präsent, sondern durch zwei bzw. mehrere Spots. Dabei musste allerdings berücksichtigt werden, dass nur distinkt auftretende Spots separat betrachtet werden durften. Spots mit ausgeprägter horizontaler Streifenbildung wurden nicht

vollständig fokussiert und erstreckten sich dadurch über einen größeren Bereich, was nicht auf Prozessierungen der Proteine in dem Bakterium zurückzuführen war.

Die identifizierten Proteine wurden mittels PSORTb Version 2.0.3 (www.psорт.org) auf das Motiv einer Signalsequenz hin untersucht. Der verwendete Algorithmus gab zusätzlich Auskunft über die mögliche Lokalisation des jeweiligen Proteins. Proteine, die extrazellulär vorliegen oder an der Außenseite des Bakteriums lokalisiert sind, besitzen in der Regel ein Signalpeptid, welches die Translokation des Proteins durch die Membranen zum Bestimmungsort induziert. Das Signalpeptid ist eine kurze N-terminale Sequenz, die nach der Sekretion des Proteins aus dem Zytoplasma abgespalten wird. Diese Prozessierung resultiert im reifen Protein. Sechs der identifizierten Proteine enthielten ein Signalpeptid: Zinc metalloprotease, ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport, hypothetical protein spr1875, General stress protein GSP-781, Serine protease und ABC transporter substrate-binding protein - amino acid transport. Eine Analyse der gefundenen Signalsequenzen erfolgte zusätzlich mit SignalP vom ExPaSy-Server (www.expasy.org) (Appel *et al.*, 1994). Damit konnte die genaue Spaltungsstelle (SS) der Signalpeptide bestimmt werden. Nur die Zink-Metalloprotease ZmpB enthielt ein LPXTG-Motiv.

Tabelle 3.2 : Identifizierte Proteine des Sekretoms mit einem Signalpeptid. Die Sequenz der Signalpeptide und die Spaltungsstellen (SS) in den Proteinen wurden angegeben.

Protein [Gen/Genlokus]]	Sequenz des Signalpeptids	SS
zmpB / spr0581	MEANMKHLKTFYKKWFQLLVVIVISFFSGALGSFS	35-36
aliA /spr0327	MKSSKLLALAGVTLLAATTLAA	22-23
- / spr1875	MKKRMLLASTVALSFAPVLATQA	23-24
gsp-781 / spr2021	MKKKILASLLLSTVMVSQVAVLTTAHA	27-28
sphtra / spr2045	MEANMKHLKTFYKKWFQLLVVIVISFFSGALGSFS	35-36
ABC-SBP / spr0146	MKKIVKYSSLAALGLVAAGVLAACSGGAKKEGEA	34-35

Von den 65 identifizierten Proteinen wurde für 55 Proteine durch PSORTb (Version 2.0.3 (www.psорт.org)) eine Lokalisation im Zytoplasma prognostiziert. PSORTb kombiniert verschiedenen Suchalgorithmen wie Motiv-Suchalgorithmen und Homologie-Suchalgorithmen zu einem Gesamtergebnis. Vielen dieser Proteine konnte eine typische und traditionelle Funktion im Zytoplasma zugeordnet werden. Es sind keine

Translokalisationsmechanismen bekannt, die diese Proteine aus der Zelle schleusen könnten, dennoch ist eine Sekretion dieser Proteine mit Übernahme zusätzlicher Funktionen im extrazellulären Proteom schon publiziert. Für die Enolase, Fructose-bisphosphate aldolase und Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase wurde eine Lokalisation auf der Zelloberfläche von *S. pneumoniae* nachgewiesen. Auf die sogenannte "moonlightening" Funktion dieser Proteine wird im Detail in der Diskussion eingegangen.

Tabelle 3.3: Identifizierte Proteine im Sekretom, für die der Software PSORTb Version 2.0.3 (www.psорт.org) keine Lokalisation im Zytoplasma prognostiziert wurde.

Lokalisation	Protein
extrazellulär	<ul style="list-style-type: none"> · General stress protein GSP-781 (spr2021) · ABC transporter substrate-binding protein - amino acid transport (spr0146)
Zellwand	<ul style="list-style-type: none"> · Zinc metalloprotease (spr0581)
Membran	<ul style="list-style-type: none"> · Enoyl-acyl carrier protein(ACP) reductase (spr0379)
unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> · hypothetical protein spr1875 (spr1875) · Serine protease (spr2045) · ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport (spr0327) · Bacterocin transport accessory protein (spr1352) · Single stranded binding protein (spr1395) · Cell division protein FtsZ (spr1510)

3.4.2 Analyse des intrazellulären Proteoms von *S. pneumoniae* D39

Für die Erstellung eines Mastergels des zytoplasmatischen Subproteoms wurden Proteinextrakte der fraktionierten Proteinextraktion verwendet. Das Zytoplasma enthielt den größten Anteil der annotierten Proteine. Damit die Dokumentation des Mastergels überschaubar bleibt, erfolgt die Darstellung der identifizierten Proteine im Mastergel in drei Teilen. Die Einteilung der Proteine erfolgt gemäß ihrer funktionellen Kategorien (COG: Clusters of Orthologous Groups of proteins → Abschnitt 3.4.5). Die Zuordnung der Proteindaten zum korrespondierenden Proteinspot erfolgt über die Nummerierung der Proteinspots im Expressionsprofil.

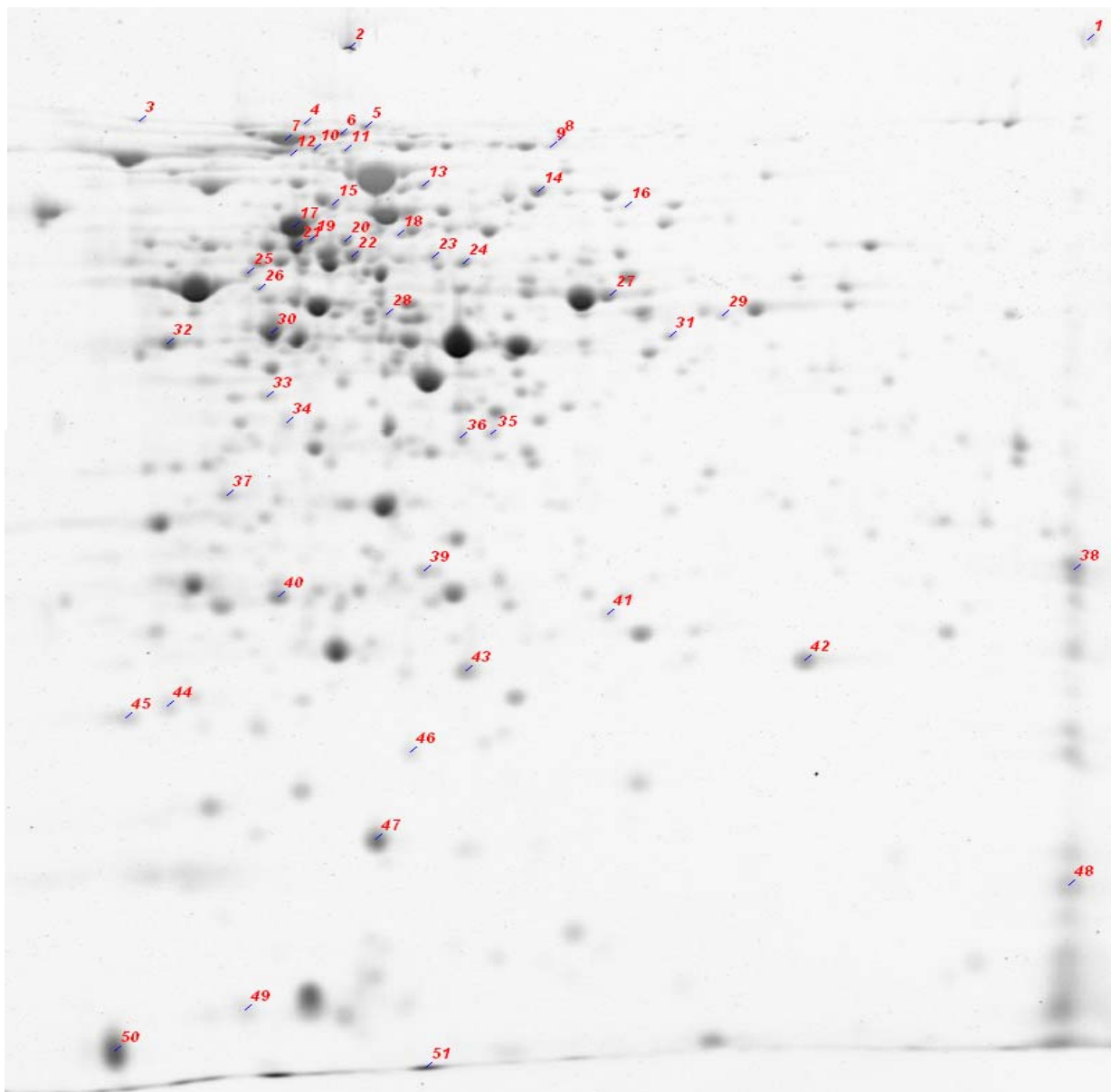


Abbildung 3.10: Expressionsprofil des zytoplasmatischen Subproteoms von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7. Die identifizierten Proteine der COG J , K und L sind markiert. Die Ergebnisse der Identifizierungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Identifizierte Proteine der COG J, K und L im zytoplasmatischen Subproteom von *S. pneumoniae* D39. Die Angabe der Spot-Nummern kennzeichnet die Lage der Proteine in Abbildung 3.10.

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	MG	COG
1	rpoC / spr1776	DNA-dependent RNA polymerase	6,68	137448	K
2	rpoB / spr1777	DNA-dependent RNA polymerase subunit beta	5,06	135932	K
3	pheT / spr0509	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	4,64	87271	J
4	leuS / spr0235	Leucyl-tRNA synthetase	4,92	94422	J
5	alaS / spr1240	Alanyl-tRNA synthetase	5,04	96522	J
6	pnpA / spr0516	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	5,11	85244	J
7	fusA / spr0250	Elongation factor G	4,86	76840	J
8	gyrB / spr0715	DNA gyrase	5,37	72250	L
9	infB / spr0481	Initiation factor IF2	8,71	102874	J
10	glyS / spr1328	Glycyl-tRNA synthetase beta chain	4,93	75477	J
11	proS / spr0243	Prolyl-tRNA synthetase	5,00	68665	J
12	aspS / spr1924	Aspartyl-tRNA synthetase (aspartate-tRNA ligase)	4,84	66271	J
13	prfC / spr0396	Peptide chain release factor 3	5,09	58445	J
14	lysS / spr0626	Lysyl-tRNA synthetase (lysine--tRNA ligase) (LYSRS)	5,32	56703	J
15	gltX / spr1881	Glutamyl-tRNA synthetase (glutamate--tRNA ligase)	4,96	55877	J
16	- / spr1843	hypothetical protein spr1843	5,46	65740	K
17+21+ 37+43	tuf / spr1343	Translation elongation factor TU	4,86	43943	J
18	hisS / spr1931	Histidyl-tRNA synthetase	5,18	48626	J
19	nusA / spr0478	Transcription termination	4,92	42815	K
20	serS / spr0372	Seryl-tRNA synthetase	5,07	50237	J
22	rpsA / spr0764	30S Ribosomal protein S1	5,05	43869	J
23	gidA / spr0844	Glucose inhibited division protein	5,17	49370	J
24	recA / spr1757	DNA recombination/repair	5,13	41924	L
25	rpoD / spr0979	RNA polymerase sigmaA FACTOR 70	4,75	42005	K
26	- / spr0004	hypothetical protein spr0004	4,79	41146	J
27	tyrS / spr1910	Tyrosyl-tRNA synthetase 1	5,46	47451	J
28	dnaN / spr0002	DNA biosynthesis; sliding clamp subunit, required for high processivity	5,04	42045	L
29	pheS / spr0507	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	5,49	42350	J
30	tsf / spr2019	Elongation factor TS	4,84	37338	J
31	ccpA / spr1813	Catabolite control protein A	5,49	38212	K
32	rpoA / spr0215	RNA polymerase alpha subunit	4,64	34243	K
33	glyQ / spr1329	Glycyl-tRNA synthase alpha chain	4,78	35040	J
34	glcK / spr0584	Glucose kinase	4,95	34164	K
35	rpsB / spr2020	30S Ribosomal protein S2	5,20	28880	J
36	exoA / spr1660	Exodeoxyribonuclease	5,19	31045	L
38	rplC / spr0188	50S Ribosomal protein L3	10,14	22164	J

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	MG	COG
39	fms / spr1310	Peptide deformylase, N-formylmethionylaminoacyl-tRNA deformylase	5,10	22735	J
40	efp / spr0392	Elongation factor P	4,86	20587	J
41	fabG / spr0381	3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	5,49	25753	J
42	frr / spr0846	Ribosome recycling factor	5,76	20630	J
44	nusG / spr1820	Transcription antitermination factor	4,76	20878	K
45	greA / spr1369	Transcription elongation factor GreA	4,63	17948	K
46	- / spr2011	hypothetical protein spr2011	5,08	21086	J
47	rplJ / spr1212	50S Ribosomal protein L10	5,08	17469	J
48	rplO / spr0208	50S Ribosomal protein L15	10,28	15436	J
49	rpsM / spr0213	30S Ribosomal protein S13	10,63	13413	J
50	rplL / spr1211	50S Ribosomal protein L12	4,35	13038	J
51	rpsF / spr1396	30S Ribosomal protein S6 (S6)	5,15	11146	J

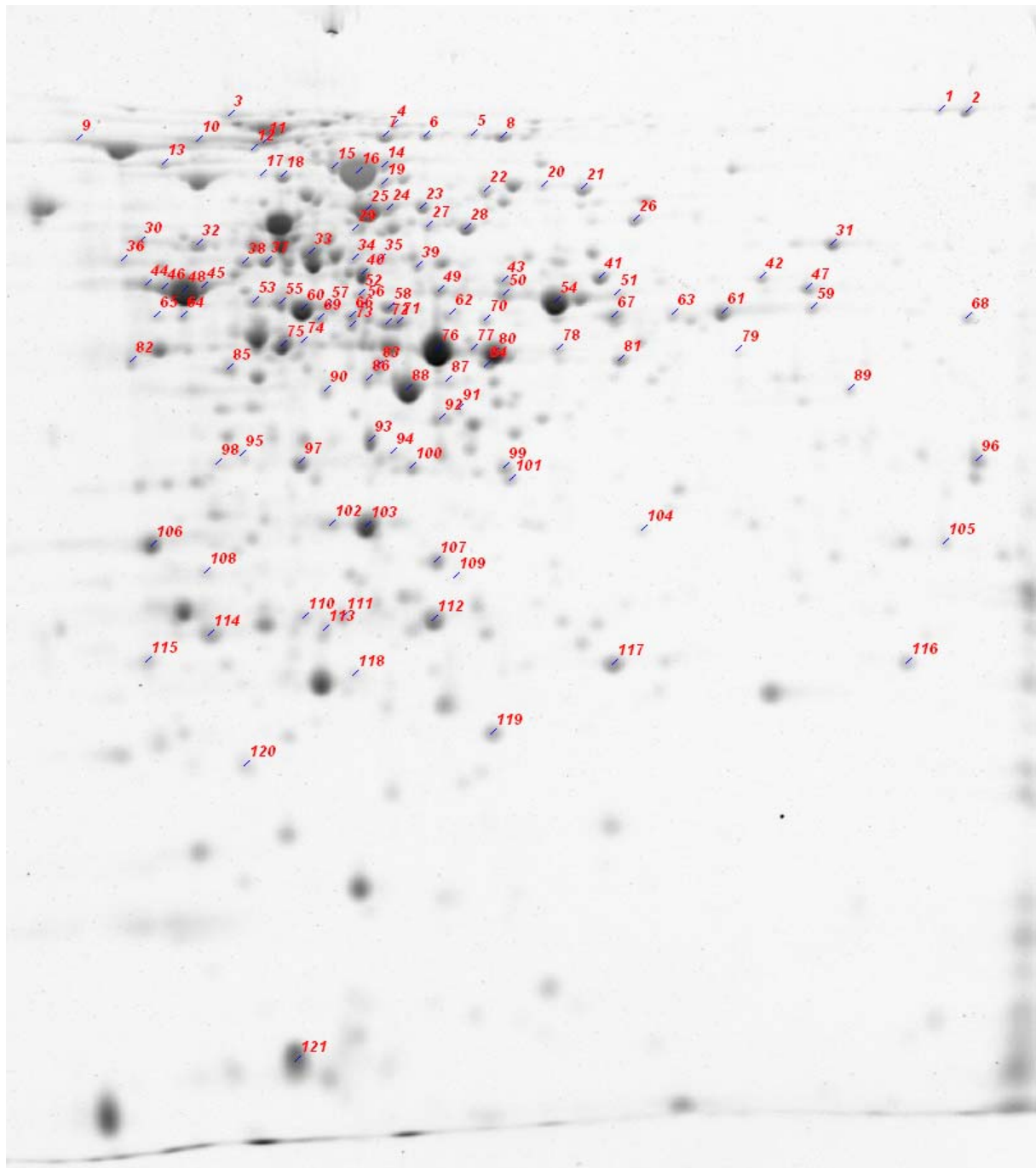


Abbildung 3.11: Expressionsprofil des zytoplasmatischen Subproteoms von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7. Die identifizierten Proteine der COG C, G, E, F, H, I und Q sind markiert. Die Ergebnisse der Identifizierungen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Identifizierte Proteine der COG C, G, E, F, H, I und Q im zytoplasmatischen Subproteom von *S. pneumoniae* D39. Die Angabe der Spot-Nummern kennzeichnet die Lage der Proteine in Abbildung 3.11.

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	Masse	COG
1+2	adhE / spr1837	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	6,06	98742	C
3	pepN / spr0706	Aminopeptidase N	4,79	95405	E
4	pull / spr1025	Thermostable pullulanase	5,15	86748	G
5+8	nrdE / spr1065	Ribonucleoside-diphosphate reductase (major subunit)	5,23	81826	F
6+91	manL / spr0261	Phosphotransferase system, mannose-specific EIIAB	5,15	35767	G
7	tktA / spr1841	Transketolase	5,05	71125	G
9	ptsI / spr1062	PTS enzyme I	4,63	63370	G
10	amiA / spr1707	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	4,95	72517	E
11	aliA / spr0327	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	5,00	73015	E
12	dexS / spr1698	Dextran glucosidase	4,77	63015	G
13	pgm / spr1351	Phosphoglucomutase	4,74	62746	G
14-16	spxB / spr0642	Pyruvate oxidase	5,03	65328	E
17+18	guaA / spr1300	Glutamine amidotransferase	4,94	57664	F
19	ilvD / spr1935	Dihydroxyacid dehydratase	5,08	60163	E
20+21	pyrG / spr0438	CTP synthetase	5,45	59505	F
22	fhs / spr1109	Formate--tetrahydrofolate ligase	5,27	59821	F
23	imdH / spr2033	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	5,18	52526	F
24+25	pykF / spr0797	Pyruvate kinase I; fructose-stimulated	5,04	54777	G
26	zwf / spr1122	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	5,51	56839	G
27+28	gapN / spr1028	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5,20	51102	C
29	metK / spr0671	S-adenosylmethionine synthetase	5,02	43089	H
30	pepV / spr0547	Dipeptidase	4,77	50775	E
31	gor / spr0692	Glutathione oxidoreductase	5,82	49002	C
32	/ spr0820	hypothetical protein spr0820	4,71	47459	E
33	pfkA / spr0796	6-phosphofructokinase I	5,33	35248	G
34+35	pepC / spr0258	Aminopeptidase C	5,09	50281	E
36	pepT / spr0913	Aminotripeptidase; tripeptidase	4,58	44857	E
37	merA / spr1442	Oxidoreductase (Mercury (II) reductase)	4,83	47317	C
38	atpD / spr1360	Proton-translocating ATPase, F1 sector, beta-subunit	4,85	50872	C
39	lysA / spr1792	Diaminopimelate decarboxylase	5,15	46848	E
40	glyA / spr0928	Serine hydroxymethyltransferase	5,06	45285	E
41	purA / spr0021	Adenylosuccinate synthetase	5,49	47712	F
42	aroA / spr1229	3-Enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthetase	5,86	46209	E
43	purB / spr0056	Adenylosuccinate lyase	5,30	49616	F
44-46+48	eno / spr1036	Enolase	4,70	47131	G
47	lysC / spr0374	Aspartate kinase	5,78	50234	E

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	Masse	COG
49+76+78 +80	gapA / spr1825	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	5,78	38910	G
50+51+54	gdhA / spr1181	NADP-specific glutamate dehydrogenase	5,43	48937	E
52	hom / spr1219	Homoserine dehydrogenase	4,98	47409	E
53	pepS / spr0254	Aminopeptidase	4,83	45248	E
55+57+60	pgk / spr0441	Phosphoglycerate kinase	4,92	41913	G
56	/ spr0773	hypothetical protein spr0773	5,05	45277	E
58	ackA / spr1854	Acetate kinase (acetokinase)	5,09	43429	C
59	aroC / spr1232	Chorismate synthase	5,87	42845	E
61+63	lctO / spr0627	Lactate oxidase	5,67	41577	C
62	aspC / spr0035	Aspartate aminotransferase	5,16	43259	E
64	pepQ / spr1445	Dipeptidase	4,73	40347	E
65	glmM / spr1417	Phosphoglucosamine mutase	4,65	48093	G
66+69	deoB / spr0732	phosphodeoxyribomutase	5,23	46943	G
67	fabF / spr0382	Beta ketoacyl-acyl carrier protein synthase	5,62	44490	I
68	msmK / spr1437	ABC transporter ATP-binding protein - multiple sugar transport	5,83	41979	G
70	arcB / spr1957	Ornithine transcarbamoylase	5,23	38001	E
71	nagA / spr1867	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	5,11	41899	G
72+73	asd / spr0918	Aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase	5,09	39128	E
74+75	ilvC / spr0403	Ketol-acid reductoisomerase	4,84	37498	E
77	/ spr0552	hypothetical protein spr0552	5,26	38188	G
79	prsA / spr0028	Phosphoribosylpyrophosphate synthase	5,39	37550	F
81	pepA / spr1682	Glutamyl aminopeptidase	5,46	38166	G
82	ppaC / spr1389	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	4,57	33458	C
83	aroF / spr1542	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (DAHP synthase); possibly tyr-sensitive	5,05	38900	E
84	adh / spr1866	Putative alcohol dehydrogenase	5,24	38695	E
85	dapA / spr0919	Dihydrodipicolinate synthase	4,81	33986	E
86+88	ldh / spr1100	L-lactate dehydrogenase	5,09	35390	C
87	aroG / spr1543	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (DAHP synthase isozyme)- possibly phe sensitive	5,29	38870	E
89	prs / spr1002	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	5,93	35331	F
90	ilvE / spr0758	Branched-chain-amino-acid transaminase	4,97	37649	E
92	gpdA / spr1902	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	5,19	36754	C
93	pyrDA / spr0672	Dihydroorotate dehydrogenase	5,03	34764	F
94	pdx1 / spr1322	Pyridoxine biosynthesis protein	5,43	32565	H
95	fruB / spr0779	Fructose-1-phosphate kinase	4,82	32745	G
96	guaC / spr1128	GMP reductase	6,13	36031	F
97	cycK / spr2015	Cysteine synthase, O-acetylserine sulfhydrylase	4,96	31854	E
98	fabD / spr0380	Malonyl acyl carrier protein transacylase	4,74	33200	I
99+101	mreA / spr1017	Macrolide-efflux protein	5,31	34501	H
100	nadE / spr1276	NAD synthetase, ammonia dependent	5,11	30174	H

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	Masse	COG
102+103	fba / spr0530	Fructose-bisphosphate aldolase	5,00	31496	G
104	ABC-SBP / spr0146	ABC transporter substrate-binding protein - amino acid transport	5,14	30666	E
105	ABC-NDB / spr1314	ABC transporter ATP-binding protein - aspartate/glutamate transport	6,01	27350	E
106	nagB / spr1272	N-acetylglucosamine-6-phosphate isomerase	4,57	26345	G
107	pnp / spr0734	Purine nucleoside phosphorylase (inosine phosphorylase)	5,15	29000	F
108	nagD / spr1264	N-acetyl-glucosamine metabolism	4,71	28191	G
109	pyrH / spr0845	UMP kinase	5,38	26676	F
110	proV / spr1678	ABC transporter ATP-binding protein - choline transporter	4,97	27082	E
111	adk / spr0210	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	4,96	23706	F
112	gpmA / spr1499	Phosphoglyceromutase	5,14	26035	G
113	cmk / spr1456	Cytidylate kinase	5,00	24583	F
114	tpiA / spr1432	Triose phosphate isomerase	4,79	27381	G
115	aroD / spr1235	3-dehydroquinate dehydratase	4,55	25703	E
116	nrd / spr0546	Nitroreductase	6,34	22643	C
117	upp / spr0655	Uracil phosphoribosyltransferase	5,60	23698	F
118	glnQ / spr1354	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	4,98	23129	E
119	hgt / spr0011	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	5,26	20256	F
120	apt / spr1435	Adenine phosphoribosyltransferase	5,31	19631	F
121	ptsH / spr1063	Histidine-containing phosphocarrier protein of the PTS	4,74	8939	G

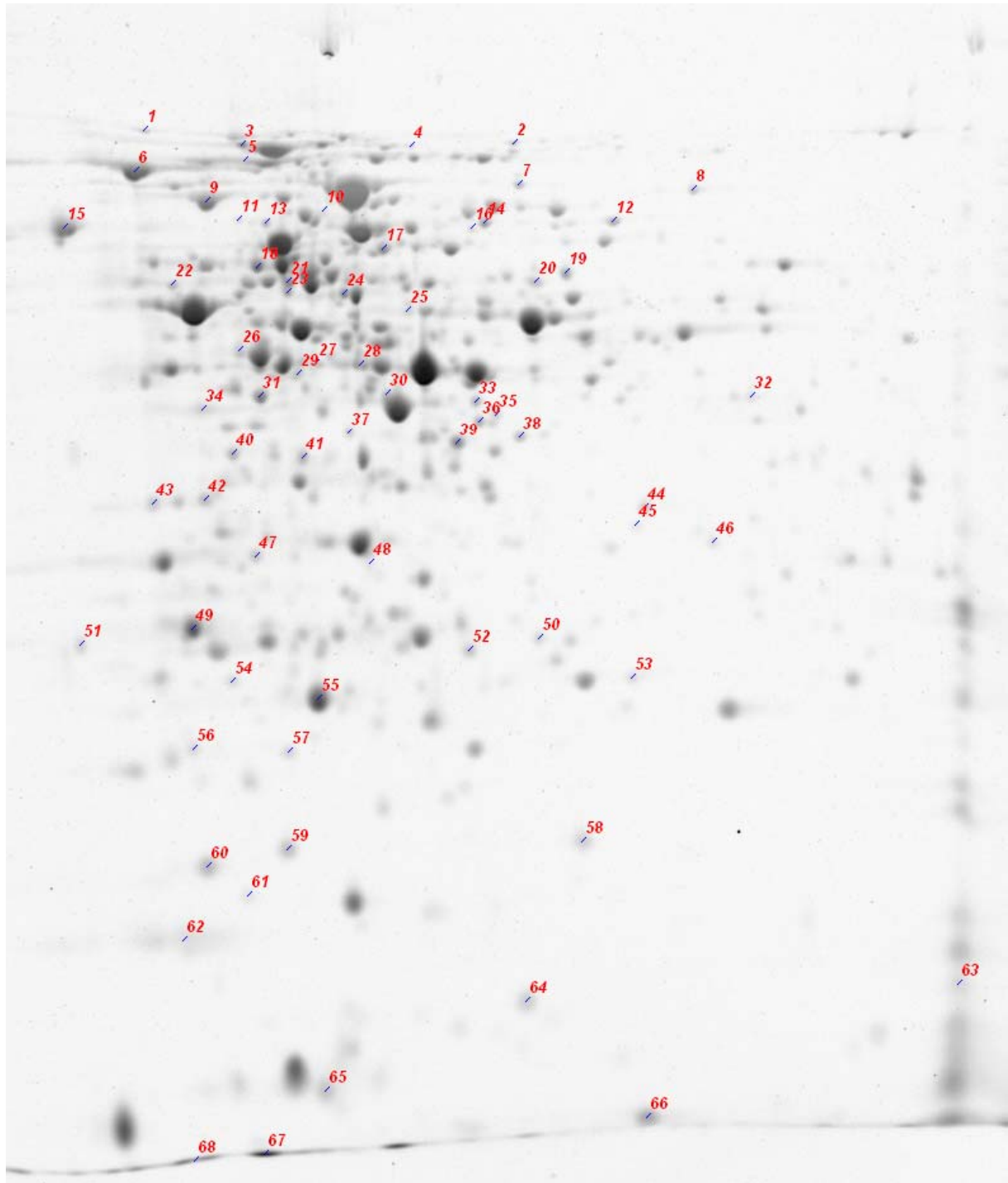


Abbildung 3.12: Expressionsprofil des zytoplasmatischen Subproteoms von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7. Die identifizierten Proteine der COG D, O, M, N, P, T und R, S und ohne Zuordnung in ein COG sind markiert. Die Ergebnisse der Identifizierungen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Identifizierte Proteine der COG D, O, M, N, P, T und R, S und ohne Zuordnung in ein COG im zytoplasmatischen Subproteom von *S. pneumoniae* D39. Die Angabe der Spot-Nummern kennzeichnet die Lage der Proteine in Abbildung 3.12.

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	Masse	COG
1	pheT / spr0509	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	4,64	87271	R
2	secA / spr1544	Preprotein translocase secA subunit	5,42	95240	-
3	typA / spr0598	GTP-binding protein TypA/BipA	4,81	68212	T
4	phpA / spr1060	Histidine Motif-Containing protein	5,39	96176	-
5	clpL / spr0307	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	4,91	77632	O
6	Dank / spr0455	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)	4,63	64772	O
7	/ spr0538	hypothetical protein spr0538	5,38	61128	R
8	/ spr0125	hypothetical protein spr0125	6,34	66706	R
9	groEL / spr1722	Chaperonin GroEL	4,77	57060	O
10	/ spr0775	hypothetical protein spr0775	4,94	52757	O
11	dltA / spr1982	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	4,82	54204	-
12	/ spr0309	hypothetical protein spr0309	5,51	55087	S
13	/ spr1393	hypothetical protein spr1393	4,82	52160	R
14	gcaD / spr0891	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	5,59	51922	M
15	tig / spr0362	Trigger factor	4,43	47269	O
16	murC / spr1373	UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase	5,43	49843	M
17	ply / spr1739	Pneumolysin	5,14	52924	-
18	/ spr0772	hypothetical protein spr0772	4,83	46325	O
19	murA / spr1781	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	5,38	45923	M
20	/ spr1654	hypothetical protein spr1654	5,50	46854	M
21	nox / spr1323	NADH oxidase	4,99	50409	R
22	ftsZ / spr1510	Cell division protein FtsZ	4,70	44389	D
23	murD / spr0603	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine--D-glutamate ligase	4,93	48549	M
24	cps2K / spr0318	The type 2 capsule locus of Streptococcus pneumoniae	5,04	46642	M
25	ftsA / spr1511	Cell division protein FtsA	5,12	49444	D
26	pspA / spr0121	pneumococcal surface protein A	4,82	38000	-
27	adhP / spr0262	Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring.	4,95	36184	R
28	/ spr0084	hypothetical protein spr0084	5,10	38338	R
29	msrA / spr1217	Peptide methionine sulfoxide reductase	4,94	35909	O
30	ppiA / spr0679	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5,47	29048	O
31	galE / spr1460	UDP-glucose 4-epimerase	4,82	37630	M
32	/ spr0747	hypothetical protein spr0747	5,46	39595	R
33	cpsN / spr0322	dTDP-glucose-4,6-dehydratase	5,26	39077	M
34	divIVA / spr1505	Cell-division initiation protein (septum placement)	4,70	30781	D
35	hprK / spr1270	HPr(ser-P)kinase/phosphatase	5,23	35422	T
36	/ spr1176	hypothetical protein spr1176	5,38	35606	R
37	ppmA / spr0884	Proteinase maturation protein	5,04	34476	O

Spot	Gen / Genlokus	Protein	pI	Masse	COG
38	fabK / spr0379	Enoyl-acyl carrier protein(ACP) reductase.	5,33	34156	R
39	galU / spr1903	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	5,24	33157	M
40	hsp33 / spr1993	Chaperonin (heat shock protein 33)	4,75	31871	O
41	cpsO / spr0323	dTDP-L-rhamnose synthase	4,86	32340	M
42	trxB / spr1312	Thioredoxin reductase	4,76	33186	O
43	/ spr1738	hypothetical protein spr1738	4,50	25814	S
44	codY / spr1439	Transcriptional pleiotropic repressor	5,55	29852	-
45	/ spr0847	hypothetical protein spr0847	5,66	33852	S
46	ABC-SBP / spr0147	ABC transporter solute-binding protein - unknown substrate	5,46	31185	P
47	cps2L / spr0320	The type 2 capsule locus of Streptococcus pneumoniae	4,79	32277	M
48	/ spr1332	hypothetical protein spr1332	5,10	31497	R
49	ABC-NBD / spr0771	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	4,81	29174	O
50	/ spr1726	hypothetical protein spr1726	5,31	23025	R
51	pppL / spr1578	Phosphoprotein phosphatase	4,47	27086	T
52	pcp1 / spr0762	Pyrrrolidone-carboxylate peptidase (5-oxoprollyl-peptidase)	5,27	23576	O
53	/ spr1402	hypothetical protein spr1402	5,81	23400	R
54	/ spr2003	hypothetical protein spr2003	5,41	37810	P
55	sodA / spr0674	Manganese co-factored superoxide dismutase	4,93	22383	-
56	grpE / spr0454	Heat-shock protein (activation of DnaK)	4,61	20858	O
57	/ spr1625	hypothetical protein spr1625	4,62	21803	-
58	ssb / spr1395	Single stranded binding protein	5,41	17341	-
59	/ spr0895	hypothetical protein spr0895	4,88	18959	-
60	tpx / spr1495	Thioredoxin-linked thiol peroxidase	4,73	19298	O
61	/ spr0332	hypothetical protein spr0332	4,69	13107	-
62	dpr / spr1430	DNA binding protein starved cells-like peroxide resistance protein	4,67	20003	P
63	/ spr0217	hypothetical protein spr0217	7,88	13559	-
65	groES / spr1723	Cochaperonin GroES	4,97	9920	O
64+66	bta / spr1352	Bacterocin transport accessory protein	5,64	13030	-
67	trxA / spr1602	Thioredoxin reductase	4,75	11584	O
68	/ spr0126	hypothetical protein spr0126	4,57	9283	-

Insgesamt konnten 208 unterschiedliche Proteine im zytoplasmatischen Subproteom identifiziert werden. Davon konnten 195 Proteine in COGs eingeordnet werden, nur 13 Proteinen konnte keine funktionelle Kategorie zugeordnet werden.

3.4.3 Analyse des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms (MP1) von *S. pneumoniae* D39

Für die Erstellung eines Mastergels des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms wurden ebenfalls die Proteinextrakte der fraktionierten Proteinextraktion verwendet. Analog zu Abschnitt 3.4.2 wurden die Proteine gemäß ihren funktionellen Kategorien (COG: Clusters of Orthologous Groups of proteins → Abschnitt 3.4.5) zugeordnet. Die Zuordnung der Proteindaten zum korrespondierenden Proteinspot erfolgt über die Nummerierung der Proteinspots im Expressionsprofil.

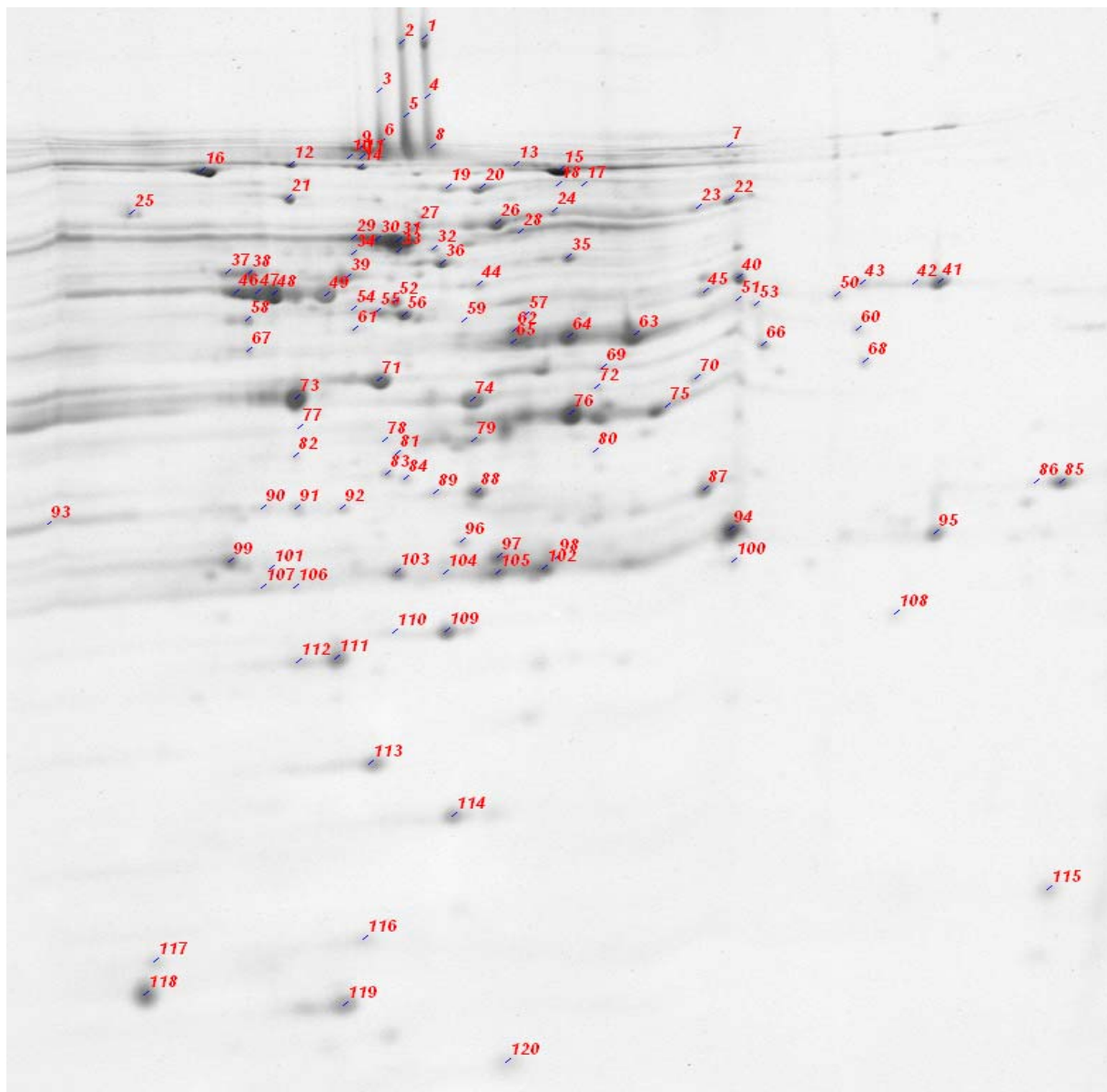


Abbildung 3.13: Expressionsprofil des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms (MP1) von *S. pneumoniae* D39 im pH-Bereich 4-7. Die identifizierten Proteine sind markiert. Die Ergebnisse der Identifizierungen sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Identifizierte Proteine im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom von *S. pneumoniae* D39. Die Angabe der Spot-Nummern kennzeichnet die Lage der Proteine in Abbildung 3.13. Es erfolgte eine Analyse der Proteine auf das Vorkommen eines Signalpeptids (SP) und von Transmembranhelices (TMH).

Spot	Gen / Genlokus	Funktion	pI	MG	COG	SP	TMH
1-6+8	pspA / spr0121	Surface protein pspA	5,12	68563	-	ja	1
7	secA / spr1544	Preprotein translocase secA subunit	5,42	95240	-	nein	0
9	fusA / spr0250	Elongation factor G	4,86	76840	J	nein	0
10+11	clpL / spr0307	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	4,91	77632	O	nein	0
12	amiA / spr1707	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	4,95	72517	E	ja	1
13	tktA / spr1841	Transketolase	5,05	71125	G	nein	0
14	aliA / spr0327	ABC transporter substrate-binding protein - oligopeptide transport	5,00	73015	E	ja	1
15+76	manL / spr0261	Phosphotransferase system, mannose-specific EIIAB	5,15	35767	G	nein	1
16	Dank / spr0455	Class I heat-shock protein (molecular chaperone)	4,63	64772	O	nein	0
17	fruA / spr0780	Fructose specific-phosphotransferase system IIBC component	5,31	66949	G	nein	11
18	/ spr1584	hypothetical protein spr1584	5,31	60193	R	nein	1
19+20	spxB / spr0642	Pyruvate oxidase	5,03	65328	E	nein	0
21	groEL / spr1722	Chaperonin GroEL	4,77	57060	O	nein	0
22+23	ABC-NBD / spr0748	ABC transporter ATP-binding protein - ribose/galactose transport	5,47	55029	R	nein	0
24	imdH / spr2033	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	5,18	52526	F	nein	0
25	tig / spr0362	Trigger factor	4,43	47269	O	nein	0
26	pykF / spr0797	Pyruvate kinase I; fructose-stimulated	5,04	54777	G	nein	0
27	atpA / spr1362	Proton-translocating ATPase, F1 sector, alpha-subunit	4,97	54668	C	nein	0
28	ply / spr1739	Pneumolysin	5,14	52924	-	nein	0
29-31+33	tuf / spr1343	Translation elongation factor TU	4,86	43943	J	nein	0
32	metK / spr0671	S-adenosylmethionine synthetase	5,02	43089	H	nein	0
34	/ spr0772	hypothetical protein spr0772	4,83	46325	O	nein	0
35+36	rpsA / spr0764	30S Ribosomal protein S1	5,05	43869	J	nein	0
37+38	ftsZ / spr1510	Cell division protein FtsZ	4,70	44389	D	nein	0
39	atpD / spr1360	Proton-translocating ATPase, F1 sector, beta-subunit	4,85	50872	C	nein	1
40+45	fabF / spr0382	Beta ketoacyl-acyl carrier protein synthase	5,62	44490	I	nein	0
41-43	msmK / spr1437	ABC transporter ATP-binding protein - multiple sugar transport	5,83	41979	G	nein	0
44	glyA / spr0928	Serine hydroxymethyltransferase	5,06	45285	E	nein	0
46-48	eno / spr1036	Enolase	4,70	47131	G	nein	0
49	malX / spr1918	ABC transporter substrate-binding protein - maltose/maltodextrin	5,10	45396	G	ja	1
50	lctO / spr0627	Lactate oxidase	5,67	41577	C	nein	0
51+63+64	gapA / spr1825	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	5,78	38910	G	nein	0

Spot	Gen / Genlokus	Funktion	pI	MG	COG	SP	TMH
52	livJ / spr0659	ABC transporter substrate-binding protein - branched chain amino acid transport	5,29	40446	E	ja	1
53	ccpA / spr1813	Catabolite control protein A	5,49	38212	K	nein	0
54-56	pgk / spr0441	Phosphoglycerate kinase	4,92	41913	G	nein	0
57	nagA / spr1867	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	5,11	41899	G	nein	0
58	rpoA / spr0215	RNA polymerase alpha subunit	4,64	34243	K	nein	0
59	deoB / spr0732	phosphodeoxyribomutase	5,23	46943	G	nein	0
60	prsA / spr0028	Phosphoribosylpyrophosphate synthase	5,39	37550	F	nein	0
61	tsf / spr2019	Elongation factor TS	4,84	37338	J	nein	0
62	ABC-SBP / spr0934	ABC transporter substrate-binding protein - iron transport	5,38	37712	P	ja	2
65+78	amiE / spr1704	ABC transporter ATP-binding protein - oligopeptide transport	5,09	39579	E	nein	0
66	ABC-NBD / spr0557	ABC transporter ATP-binding protein - role in polysaccharide efflux	5,50	37867	V	nein	0
67	divIVA / spr1505	Cell-division initiation protein (septum placement)	4,70	30781	D	nein	0
68	plsX / spr0037	Involved in fatty acid/phospholipid synthesis	5,72	34896	I	nein	2
69	atpG / spr1361	Proton-translocating ATPase, F1 sector, gamma-subunit	5,13	32418	C	nein	0
70	fabK / spr0379	Enoyl-acyl carrier protein(ACP) reductase.	5,33	34156	R	nein	3
71	/ spr0747	hypothetical protein spr0747	5,46	39595	R	nein	1
72	sphtra / spr2045	Serine protease	6,15	42262	O	ja	0
73	ppmA / spr0884	Proteinase maturation protein	5,04	34476	O	ja	1
74	ldh / spr1100	L-lactate dehydrogenase	5,09	35390	C	nein	0
75	pfkA / spr0796	6-phosphofructokinase I	5,33	35248	G	nein	0
77	hsp33 / spr1993	Chaperonin (heat shock protein 33)	4,75	31871	O	nein	0
79	- / spr2003	hypothetical protein spr2003	5,41	37810	P	ja	1
80	rpsB / spr2020	30S Ribosomal protein S2	5,20	28880	J	nein	0
81	cycK / spr2015	Cysteine synthase, O-acetylserine sulfhydrylase	4,96	31854	E	nein	0
82	fabD / spr0380	Malonyl acyl carrier protein transacylase	4,74	33200	I	nein	1
83	/ spr0931	hypothetical protein spr0931	5,46	35377	S	ja	1
84	ABC-SBP / spr0147	ABC transporter solute-binding protein - unknown substrate	5,46	31185	P	ja	1
85+86	ABC-NDB / spr1314	ABC transporter ATP-binding protein - aspartate/glutamate transport	6,01	27350	E	nein	0
87	pstB / spr1253	ABC transporter ATP-binding protein - phosphate transport	5,36	27993	P	nein	0
88+89	fba / spr0530	Fructose-bisphosphate aldolase	5,00	31496	G	nein	0
90	nagB / spr1272	N-acetylglucosamine-6-phosphate isomerase	4,57	26345	G	nein	0
91	ABC-SBP / spr0146	ABC transporter substrate-binding protein - amino acid transport	5,14	30666	E	ja	1
92	cps2L / spr0320	The type 2 capsule locus of Streptococcus pneumoniae	4,79	32277	M	nein	1
93	- / spr1625	hypothetical protein spr1625	4,62	21803	-	nein	0
94	ABC-NBD / spr1559	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	5,71	26664	-	nein	0
95	glnQ / spr1121	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,80	27391	E	nein	0

Spot	Gen / Genlokus	Funktion	pI	MG	COG	SP	TMH
96	fms / spr1310	Peptide deformylase, N-formylmethionylaminoacyl-tRNA deformylase	5,10	22735	J	nein	0
97	glnQ / spr0728	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,05	27100	E	nein	0
98+102	gpmA / spr1499	Phosphoglyceromutase	5,14	26035	G	nein	0
99	trkA / spr0071	Trk transporter NAD ⁺ binding protein - K ⁺ transport	4,84	24818	P	nein	1
100	upp / spr0655	Uracil phosphoribosyltransferase	5,60	23698	F	nein	2
101	ABC-NBD / spr0771	ABC transporter ATP-binding protein - unknown substrate	4,81	29174	O	nein	0
103	proV / spr1678	ABC transporter ATP-binding protein - choline transporter	4,97	27082	E	nein	0
104	adk / spr0210	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	4,96	23706	F	nein	0
105	glnQ / spr0408	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine	5,14	27856	E	nein	0
106+107	tpiA / spr1432	Triose phosphate isomerase	4,79	27381	G	nein	0
108	frf / spr0846	Ribosome recycling factor	5,76	20630	J	nein	0
109	glnQ / spr1354	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	4,98	23129	E	nein	0
110	sodA / spr0674	Manganese co-factored superoxide dismutase	4,93	22383	P	nein	0
111+112	/ spr1508	hypothetical protein spr1508	4,79	20738	S	nein	0
113	/ spr0895	hypothetical protein spr0895	4,88	18959	-	nein	0
114	rplJ / spr1212	50S Ribosomal protein L10	5,08	17469	J	nein	0
115	atpC / spr1359	Proton-translocating ATPase, F1 sector, epsilon-subunit	5,94	15628	C	nein	1
116	ptsH / spr1063	Histidine-containing phosphocarrier protein of the PTS	4,74	8934	G	nein	0
117	/ spr1267	hypothetical protein spr1267	4,43	14418	-	nein	1
118	rplL / spr1211	50S Ribosomal protein L12	4,35	13038	J	nein	0
119	/ spr0332	hypothetical protein spr0332	4,69	13107	-	nein	0
120	rpsF / spr1396	30S Ribosomal protein S6 (S6)	5,15	11146	J	nein	0

Es wurden 120 Proteinspots im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom identifiziert, die 90 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden konnten. Mit den Suchalgorithmen von PSORTb Version 2.0.3 wurde die Lokalisation der Proteine ermittelt. Dabei wurde die Sequenz der Proteine auch nach einem Signalpeptid und Transmembranhelices (TMH) durchsucht. Es wurden 12 Proteine mit Signalpeptid identifiziert und 25 Proteine, die mindestens eine TMH enthielten. Ein Protein, dessen Sequenz drei oder mehr TMHs enthielt, war ein integrales Membranproteine. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich demnach zwei integrale Membranproteine. Die Sequenz der Enoyl-acyl carrier protein(ACP) reductase enthielt gemäß dem bei PSORTb verwendeten Suchalgorithmus HMMTOP+ drei Transmembran- α -Helices. Die Sequenz von Fructose specific-phosphotransferase system IIBC component enthielt 11 TMHs. Die

identifizierten Proteine, die eine Signalsequenz besaßen, hatten ebenfalls mindestens eine TMH. Eine detaillierte Analyse der gefundenen Signalpeptide erfolgte mit SignalP vom ExPaSy-Server (www.expasy.org). Damit konnte die genaue Spaltungsstelle (SS) der Signalpeptide bestimmt werden. In dieser Fraktion wurde kein Protein mit LPXTG-Motiv identifiziert. Es wurde das Lipoprotein PpmA und das cholinbindende Protein PspA identifiziert.

Tab. 3.8: Identifizierte Proteine des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms mit einem Signalpeptid. Die Sequenz der Signalpeptide und die Spaltungsstellen (SS) in den Proteinen wurden angegeben.

Protein [Gen/Genlokus]]	Sequenz des Signalpeptids	SS
- / spr0931	MRKKLFLTSAAILWAVTAMNSVHA	24-25
- / spr2003	MKKTWKVFLTLVTALVAVVLVACGQGTASK	30-31
ABC-SBP / spr0146	MKKIVKYSSLAALGLVAAGVLAACSGGAKKEGEA	34-35
ABC-SBP / spr0147	MKIKKWLGLAALATVAGLALA	21-22
ABC-SBP / spr0934	MKNKFFLIAILAMCIVFSACSSNSVKNE	28-29
aliA /spr0327	MKSSKLLALAGVTLLAATTLAA	22-23
amiA / spr1707	MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSKSSDSSA	33-34
livJ / spr0659	MKKKFALSFVALASVALLAACGEVKSGA	27-28
malX / spr1918	MSSKFMKSTAVLGTVTLASLLLVACGSKTA	30-31
ppmA / spr0884	MKKKLLAGAITLLSVATLAACSKG	24-25
pspA / spr0121	MNKKKMILTSLASVAILGAGFVASQPTVVRA	31-32
sphtra / spr2045	MEANMKHLKTFYKKWFQLLVIVISFFSGALGSFS	35-36

Von den identifizierten Proteinen des Subproteoms MP1 konnten lediglich 33 % eine nicht-zytoplasmatische Lokalisation zugewiesen werden. Die meisten identifizierten Proteine der ABC Transporter Familie und die beiden integralen Membranproteine wurden der Zytoplasma-Membran zugeordnet. Zwei Substrat-bindenden Domänen von ABC Transportern amiA (spr1707) und aliA (spr0327) wurden als Oberflächen-lokalisierte Proteine eingestuft. Den fünf weiteren identifizierten Substrat-bindenden Domänen von ABC Transportern konnte mit PSORTb keine eindeutige Lokalisation zugewiesen werden. Diese enthielten allerdings alle ein Signalpeptid, welches die Translokation durch die Membranen an die Oberfläche induziert. Des weiteren kann Aufgrund ihrer Substrat-bindenden Funktion

davon ausgegangen werden, dass diese Proteine ebenfalls auf der Pneumokken-Oberfläche präsent sind.

3.4.4 Analyse des Subproteoms der schwer löslichen Proteine (MP2) von *S. pneumoniae* D39

Nach der ersten Extraktion von Proteinen aus dem Zelltrümmersediments wurden einige Membran-assoziierte Proteine identifiziert. Durch die Erhöhung der Stringenz der Extraktionsbedingungen sollten schwer lösliche Proteine, wie z.B. typische Membranproteine, extrahiert werden. Die Auftrennung des Subproteoms erfolgte in der eindimensionalen SDS-PAGE, da die Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) im Extraktionspuffer die isoelektrische Fokussierung negativ beeinflusst. Die Identifizierung der eindimensional aufgetrennten Proteinbanden erfolgte ebenfalls mit MALDI-TOF-MS.

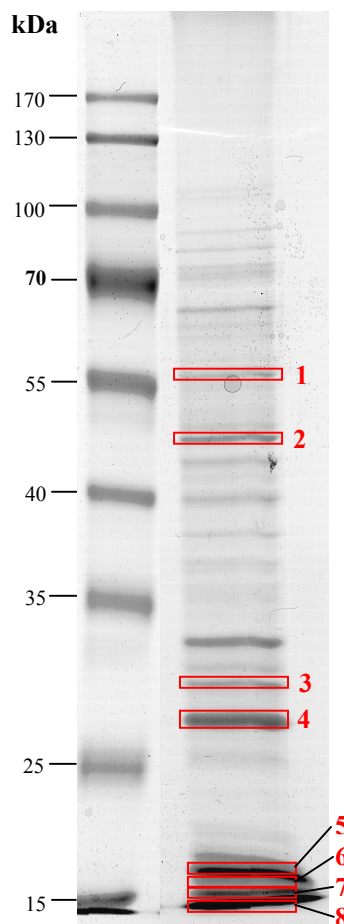


Abbildung 3.14: Eindimensional aufgetrenntes Subproteom der schwer löslichen Proteine (MP2) von *S. pneumoniae* D39. Die in der MALDI-TOF-MS identifizierten Proteinbanden sind rot markiert. Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Identifizierte Proteine des Subproteoms der schwer löslichen Proteine (MP2) von *S. pneumoniae* D39.

Nr.	Gen / Genlokus	Protein	pI	MG	COG
1	tuf / spr1343	Translation elongation factor TU	4,86	43943	J
2	eno / spr1036	Enolase	4,70	47131	G
3	spr0188 / rplC	50S Ribosomal protein L3	10,14	22164	J
4	spr0195 / rpsC	30S Ribosomal protein S3	9,69	24031	J
5	spr0249 / rpsG	30S Ribosomal protein S7	10,29	17745	J
6	spr0248 / rpsL	30S Ribosomal protein S12	11,53	15134	J
7	spr0272 / rpsI	30S Ribosomal protein S9	10,86	14226	J
8	spr1171 / rplS	50S Ribosomal protein L19	10,93	13142	J

Es konnten acht Proteinbanden durch die MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Durch die hohe Komplexität der Proben waren die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS nicht immer eindeutig. Das Resultat davon war eine geringe Identifizierungsrate. Neben sechs ribosomalen Proteinen mit auffallend basischem pI wurden die eigentlich typisch zytoplasmatische Proteine Enolase und Translation Elongation Factor TU identifiziert. Diese beiden typisch intrazellulären Proteine wurden in jedem in dieser Arbeit analysierten Subproteome identifiziert. Sie haben vermutlich eine starke Affinität zu der Membran oder Zellwand. Es konnten keine weiteren Membran-assoziierten Proteine identifiziert werden.

3.4.5 Auswertung der Proteomdaten von *S. pneumoniae* D39

Durch die Analyse des Genoms können die potenziellen Möglichkeiten eines Organismus ermittelt werden. Die tatsächlichen Möglichkeiten können dagegen nur mit Hilfe der Genprodukte, den Proteinen, wiedergegeben werden. Da theoretisch errechnete Proteomdaten auf der Basis der Genomanalyse erfolgen, sind diese zur Bestimmung realer Verhältnisse ungeeignet. Die experimentelle Bestimmung eines Proteoms unter definierten Bedingungen mit der 2D-Gelelektrophorese zeigt dagegen den tatsächlichen Zustand einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt.

Im Verlauf der durchgeführten Proteomanalyse von *Streptococcus pneumoniae* D39 wurden insgesamt 1000 Spots per Hand und dank freundlicher Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie in Greifswald 1000 weitere Spots mittels automatisierter Methoden analysiert. Von allen analysierten Proteinspots konnten 1120 identifiziert werden. Das Genom von *S. pneumoniae* R6 enthält 2043 ORFs (open reading frames) [Hoskins *et al*, 2001]. Von den annotierten Proteinen besitzen 1226 (Abschätzung mit JVirGel, www.jvirgel.de) einen isoelektrischen Punkt im analysierten Bereich zwischen 4 und 7. Davon konnten 240 Proteine im experimentell erstellten Proteom identifiziert werden. Die Annotation des Genoms beinhaltet eine Kategorisierung der Genprodukte in funktionelle Gruppen (COG: Clusters of Orthologous Groups of proteins) [Tatusov *et al*, 1997; Tatusov *et al*, 2003]. Von den 2043 annotierten Proteinen sind 1752 in den COGs unterteilt. Die Einteilung der Proteine in die COGs wurde bereits in den vorhergehenden Versuchsteilen übernommen und ist in den Proteintabellen aufgeführt.

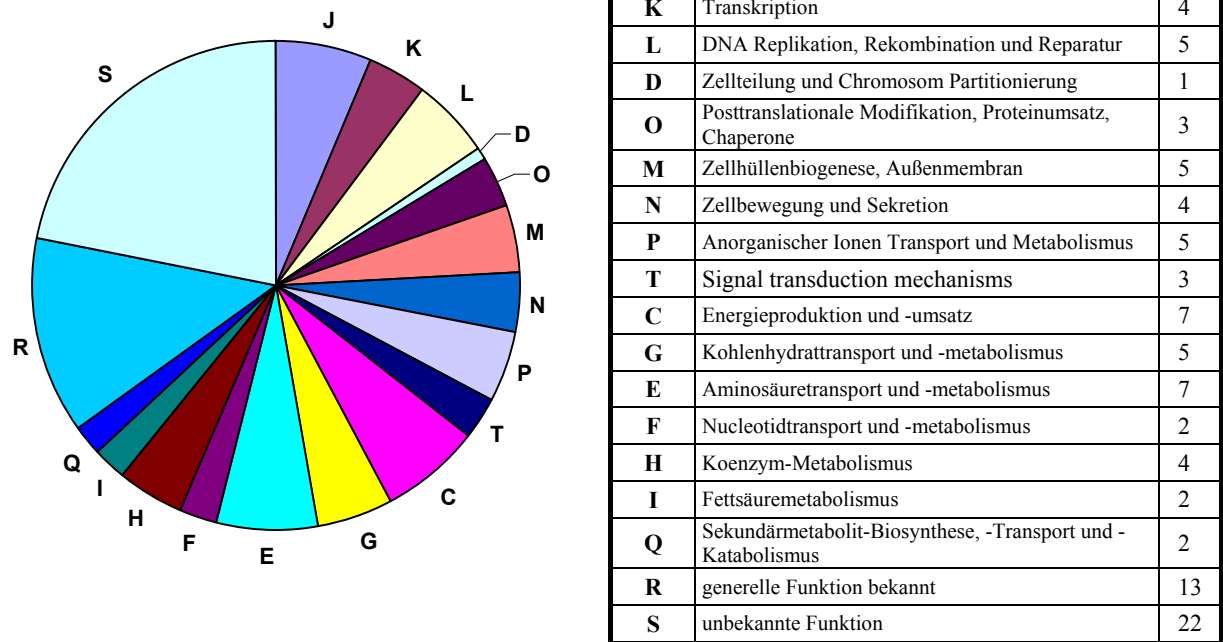


Abbildung 3.15: Prozentualer Anteil der einzelnen COGs an den 1752 kategorisierten Proteine des Genoms von *S. pneumoniae* R6

Die meisten identifizierten Proteine waren aus den funktionellen Kategorien "Translation, Ribosomale Strukturen and Biogenese" (J) und "Aminosäuretransport und -metabolismus" (E). Beiden Kategorien konnten je 39 Proteine zugeordnet werden. Der "Kohlenhydrattransport und –metabolismus" (G) folgte mit 27 identifizierten Proteinen. Für den "Energieproduktion und –umsatz" (C) wurden 14 Proteine identifiziert. In der Tabelle 3.9 ist die Verteilung der annotierten Proteine und der in dieser Arbeit identifizierten Proteine aufgeführt.

Abbildung 3.10: Einteilung des aus dem Genom theoretisch ermittelten Proteoms und der in dieser Arbeit identifizierten Proteine in funktionelle Kategorien (COG: Clusters of Orthologous Groups of proteins).

Code	Funktionelle Kategorie	theoretisch	identifiziert
	Information-Archivierung und -Bearbeitung		
J	Translation, Ribosomale Strukturen and Biogenese	217	39
K	Transkription	132	10
L	DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	184	4
	Zelluläre Prozesse		
D	Zellteilung und Chromosom Partitionierung	32	3
O	Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone	110	18
M	Zellhüllenbiogenese, Außenmembran	155	11
N	Zellbewegung und Sekretion	133	-
P	Anorganischer Ionen Transport und Metabolismus	160	6
T	Signaltransduktion Mechanismen	97	3
	Metabolismus		
C	Energieproduktion und -umsatz	224	14
G	Kohlenhydrattransport und -metabolismus	171	27
E	Aminosäuretransport und -metabolismus	233	39
F	Nucleotidtransport und -metabolismus	85	18
H	Koenzym-Metabolismus	154	4
I	Fettsäuremetabolismus	75	3
Q	Sekundärmetabolit-Biosynthese, -Transport und -Katabolismus	62	-
	ungenügende Charakterisierung		
R	generelle Funktion bekannt	449	16
S	unbekannte Funktion	750	5
	keiner funktionellen Kategorie zugeordnet	291	20

Von den 240 identifizierten Proteinen wurden 120 nur im zytoplasmatischen Subproteom, 22 nur im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom, 4 ausschließlich im Sekretom und 5 nur im Subproteom der schwer löslichen Proteine gefunden. 89 Proteine waren entsprechend in zwei oder mehr Subproteomen präsent.

Tabelle 3.11: Verteilung der Proteine, die in mehr als einem Subproteom identifiziert wurden.

Subproteom	identifizierte Proteine
Zytoplasma + Membran- bzw. Zellwand-assoziiert + Sekretom	38
Zytoplasma + Membran- bzw. Zellwand-assoziiert	29
Membran- bzw. Zellwand-assoziiert + Sekretom	1
Zytoplasma + Sekretom	21

Bei densitometrischer Betrachtung der Expressionsprofile fiel eine starke Präsenz von Enolase, Translation elongation factor TU, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und L-lactate dehydrogenase im zytoplasmatischen Subproteom (ZP), Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom (MP1) und dem Sekretom auf. Die Enolase und der Translation elongation factor TU wurden auch im Subproteom MP2 identifiziert. Es handelte sich bei den Proteinen um typische zytoplasmatische Proteine, deren starkes Auftreten in den anderen Subproteomen ein Hinweis auf weitere Funktionen gibt. Proteine mit mehreren Funktionen werden "moonlightening" Proteine genannt.

Einige Proteine wurden in mehreren Spots eines Expressionsprofil identifiziert. Sie waren omnipräsent. Da es dabei nur eine an der Gesamtmenge der identifizierten Proteine gemessen geringe Anzahl der Proteine handelte, konnte eine proteolytische Veränderung dieser Proteine nach dem Zellaufschluss ausgeschlossen werden. Die Omnipräsenz wurde daher auf unterschiedliche Modifikationen dieser Proteine zurückgeführt. In den meisten Fällen handelte es sich um eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes (IP). Die Enolase wurde beispielsweise im Subproteom ZP und MP1 in bis zu vier in der horizontalen verschobene Proteinspots identifiziert. Für das General stress protein GSP-781 im Sekretom wurden drei im IP verschobene Spots detektiert. Auch einige ABC Transporter Proteine im Subproteom MP1 traten in je zwei Modifikationen auf. Die Auflösung der Spots wurde bei der Bewertung der IP-Verschiebungen berücksichtigt, da eine schlechte Fokussierung horizontale Streifenbildung verursacht, die verzerrte Proteinspots zur Folge hatte. Nur wenige Proteine waren deutlich im Molekulargewicht verschoben. Darunter waren der Translation factor TU, der bei drei verschiedenen Molekulargrößen detektiert wurde (vgl. Subproteom ZP). Das Protein Phosphotransferase system, mannose-specific EIIAB war einmal dem vorhergesagten Molekulargewicht (~35 000 Da) und einmal bei doppelten Molekulargewicht (~ 70 000 Da)

detektierbar (vgl. Subproteom ZP und MP1). Dieses Protein lag demnach einmal als Monomer und einmal in dimerer Form vor.

Im Subproteom MP1 konnten vermehrt Proteine der ABC Transporter Familie angereicherter werden, die aufgrund ihrer Funktion mit den membrandurchspannenden Domänen ihres ABC Transporter Funktionskomplexes an der Zellmembran assoziiert waren.

Drei Sekretom-spezifischen Proteine enthielten eine Signalsequenz (Gsp-781, ZmpB, hypothetisches Protein spr1875). Das hypothetische Protein spr1994, ebenfalls spezifisch für das Sekretom, enthielt keine Signalsequenz. In der Diskussion wird die identifizierten Oberflächenproteine ohne Signalsequenz detailliert eingegangen.

3.5 Vergleichende Proteomanalyse zwischen *S. pneumoniae* D39 und der isogenen *pavA*-Mutante *S. pneumoniae* PN28

Im Sepsis-Modell der Maus ist die isogene *S. pneumoniae* D39 Mutante $\Delta pavA$ PN28 in ihrer Virulenz geschwächt. Die Virulenz der *pavA*-Mutante ist so stark attenuiert, dass vermutet wird, dass PavA eine möglicher Modulator anderer in der Pathogenese wichtiger Faktoren von *S. pneumoniae* ist. Differentiell auftretende Proteine beim Vergleich der Expressionsprofile zwischen dem parentalen *S. pneumoniae* D39 und der isogenen Mutante PN28 können daher potenziell Funktionen in der Virulenz von Pneumokokken haben. Für die Analysen wurden je drei Gele der einzelnen Subproteome von *S. pneumoniae* D39 mit je drei Gelen der einzelnen Subproteome von der isogenen *S. pneumoniae pavA*-Mutante PN28 verglichen. Die Addition der drei Gele ergab für jedes Subproteom der beiden Stämme ein sogenanntes Referenzgel, welche die Grundlage für die vergleichende Proteomanalyse bildeten. Die Referenzgele bildeten im Abschnitt 3.2 auch die Grundlage für die Erstellung der Mastergele von *S. pneumoniae* D39. Im folgenden werden repräsentative Gele der Vergleichsanalysen vorgestellt. Für die vergleichende Proteomanalyse wurden die Proteinextrakte der fraktionierten Proteinextraktion verwendet.

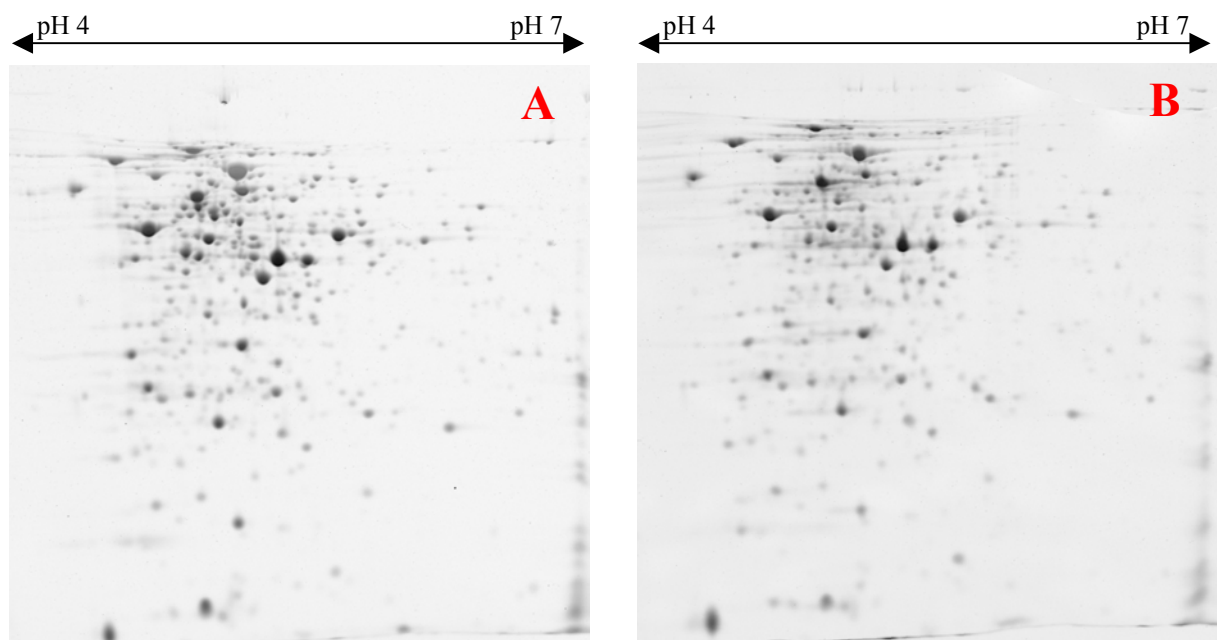


Abbildung 3.16: Expressionsprofile der zytoplasmatischen Subproteome von *S. pneumoniae* D39 (**A**) und der isogenen *pavA*-Mutante PN28 (**B**) im pH-Bereich 4-7 aufgetrennt.

Der Vergleich der zytoplasmatischen Subproteome (Abb. 3.16) ergab keine reproduzierbaren Unterschiede. Innerhalb der Expressionsprofile jedes Subproteoms gab es Abweichungen, die natürlicherweise durch die Dynamik des Stoffwechsels der Bakterien hervorgerufen wurden. Daher musste ein differentiell produziertes Protein in drei unabhängig voneinander erstellten Expressionsprofile auftreten, bevor es zum Referenzgel gezählt wurde.

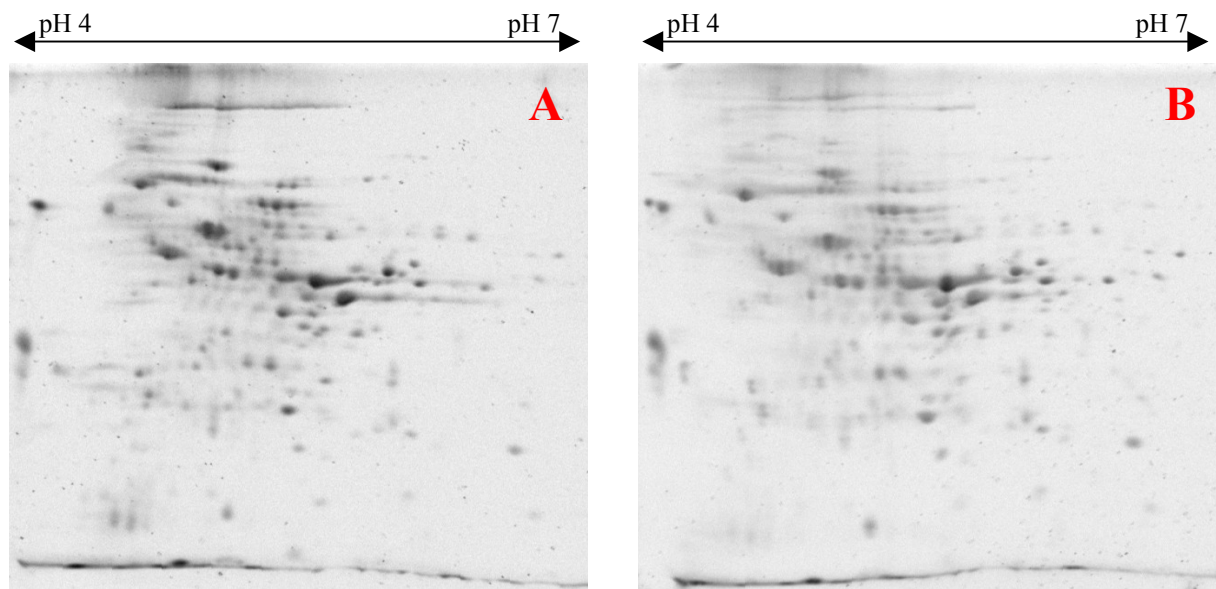


Abbildung 3.17: Expressionsprofile der extrazellulären Subproteome von *S. pneumoniae* D39 (A) und der isogenen *pavA*-Mutante PN28 (B) im pH-Bereich 4-7 aufgetrennt.

Auch im extrazellulären Subproteom, dem Sekretom, konnten keine reproduzierbare Unterschiede zwischen *S. pneumoniae* D39 und der isogenen *pavA*-Mutante PN28 nachgewiesen werden (Abb. 3.17).

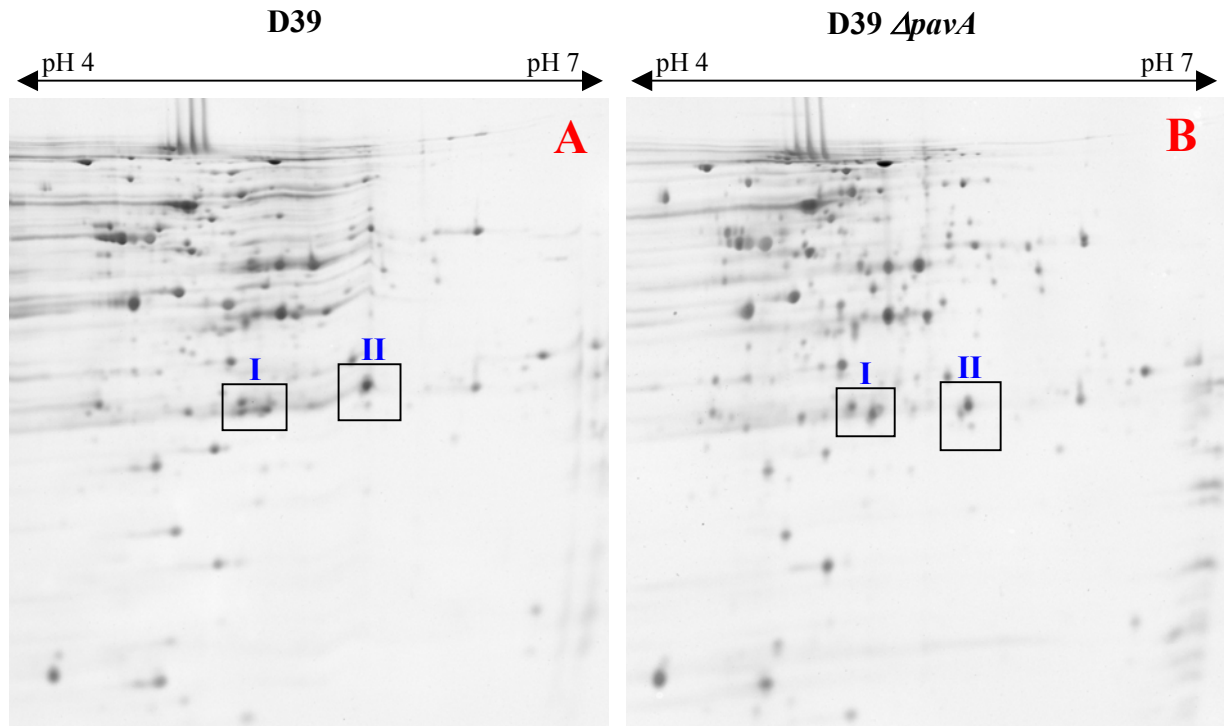
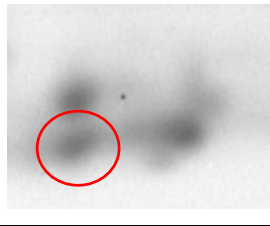

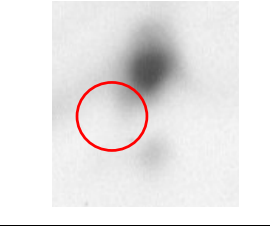
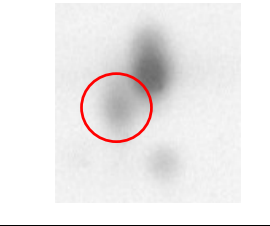


Abbildung 3.18: Expressionsprofile der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteome von *S. pneumoniae* D39 (A) und der isogenen *pavA*-Mutante PN28 (B) im pH-Bereich 4-7. Im Vergleich der Proteinmuster wurden zwei differenziell auftretende Proteinspots detektiert. Ausschnitte, die diese Proteine enthalten, sind in der Abbildung markiert und in Tabelle xx vergrößert dargestellt.

In den Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteomen wurden zwei differenziell auftretende Proteine detektiert (Abb. 3.18 A und B). Diese beiden Proteine waren unterschiedlich reguliert. Eines der beiden Proteine konnte im Expressionsprofil von *S. pneumoniae* D39 (Abb. 3.18 A) detektiert werden und war im Expressionsprofil der isogenen *pavA*-Mutante PN28 (Abb. 3.18 B) nicht mehr nachweisbar. Die Inaktivierung des *pavA*-Gens hatte demnach einen negativen Einfluss auf die Produktion dieses Proteins. Das andere differenziell auftretende Protein war in der isogenen *pavA*-Mutante PN28 präsent, konnte jedoch nicht im Expressionsprofil von *S. pneumoniae* D39 detektiert werden. Die Inaktivierung des *pavA*-Gens hatte demnach einen positiven Einfluss auf die Produktion dieses Proteins. Die Proteinspots wurden je drei mal mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Trotz mehrfacher Analyse konnte nur eines der beiden Proteine identifiziert werden. Das in der isogenen *pavA*-Mutante negativ regulierte Protein konnte als ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport (*glnQ*) identifiziert werden.

Tabelle 3.12: Vergrößerte Abschnitte der vergleichenden Proteomanalyse der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteome aus Abbildung 3.18 mit Darstellung der differenziell auftretenden Proteine und deren Identifizierung.

Abschnitt	<i>S. pneumoniae</i> D39	<i>S. pneumoniae</i> D39 <i>ΔpavA</i> PN28	Protein
I			ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport
II			nicht identifiziert

Im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind sieben Gene mit der Bezeichnung *glnQ* annotiert (Tab. 3.13), die für die ATP-bindende Domäne von ABC Glutamintransporter kodieren. Im Mastergel des Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms von *S. pneumoniae* D39 konnten vier der sieben annotierten *glnQ*-Gene als Proteinprodukt nachgewiesen werden. Die Inaktivierung des PavA kodierenden Gens führte zur Repression eines dieser Proteinprodukte (spr0408) im Expressionsprofil der isogenen *pavA*-Mutante PN28.

Tabelle 3.13: Im Genom von *S. pneumoniae* R6 vorhandene Gene für *glnQ*. Vier der Proteinprodukte konnten im Mastergel des Subproteoms der Membran-assoziierten Proteine detektiert werden. Das differenziell auftretende Proteinprodukt von *glnQ* ist rot markiert

Gen	Gen- lokus	Funktion	pI	MG	S. p. D39	S. p. D39 Δ pavA PN28	Lokalisation im Genom
<i>glnQ</i>	<i>spr0408</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,14	27 873	+	-	403910 - 404650
<i>glnQ</i>	<i>spr0535</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	4,67	12 665	-	-	534266 - 534610
<i>glnQ</i>	<i>spr0536</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	9,30	14 367	-	-	534635 - 53502
<i>glnQ</i>	<i>spr0622</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,15	28 190	-	-	630285 - 631043
<i>glnQ</i>	<i>spr0728</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,05	27 117	+	+	727536 - 728270
<i>glnQ</i>	<i>spr1121</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	5,10	27 351	+	+	1121823 - 1122563
<i>glnQ</i>	<i>spr1354</i>	ABC transporter ATP-binding protein - glutamine transport	4,98	23 143	+	+	1336952-1337581

Die Proteinsequenzen der *glnQ*-Genprodukte zeigten verhältnismäßig geringe Homologien untereinander auf. Die maximale Homologie von *spr0408* war mit 56,6 % zu *spr0728*. Die prozentuale Angabe der übereinstimmenden Aminosäuren der *glnQ*-Genprodukte sind in Tabelle 3.14 aufgeführt. Der Homologievergleich der Sequenzen ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

Tabelle 3.14 : Prozentuale Angabe der übereinstimmenden Proteinsequenzen der *glnQ*-Genprodukte. Die Werte für das identifizierte *glnQ*-Genprodukt sind blau markiert.

	<i>spr0408</i>	<i>spr0535</i>	<i>spr0536</i>	<i>spr0622</i>	<i>spr0728</i>	<i>spr1121</i>	<i>spr1354</i>
<i>spr0408</i>	-	50.9	43.4	51.2	56.6	53.7	42.6
<i>spr0535</i>	50.9	-	2.6	47.4	61.4	62.3	29.8
<i>spr0536</i>	43.4	2.6	-	44.2	45.7	41.9	39.5
<i>spr0622</i>	51.2	47.4	44.2	-	49.2	45.9	45.5
<i>spr0728</i>	56.6	61.4	45.7	49.2	-	64.3	43.1
<i>spr1121</i>	53.7	62.3	41.9	45.9	64.3	-	43.1
<i>spr1354</i>	42.6	29.8	39.5	45.5	43.1	43.1	-

	100	110	120	
90	F N L F E N L N V L E N T I V A Q T T V L K R E R T E A E K			spr0408
1	- -			spr0535
89	F N L Y P H K T V L E N V T L A P I K V L G I D K K E A E K			spr0536
90	Y E L F P H L D V L Q N L I L G P I K A Q G R D K K E V T E			spr0622
90	F N L F P N M T V M E N I T L S P I K T K G E S R E V A E K			spr0728
90	F N L F P H M S V L D N I T F A P I E H K L M T K E E A E K			spr1121
83	F Q L F P H L S V L E N L T L S P V K T M G M K Q E E A E K			spr1354
	130	140	150	
120	I A K E N L E K V G M G E R Y W Q A K P K Q L S G G Q K Q R			spr0408
1	- -			spr0535
119	T A Q K Y L E F V N M			spr0536
120	E A L Q L L E R V G L L D K - Q H S F A R Q L S G G Q K Q R			spr0622
120	R A Q E L L E K V G L P D K - A D A Y P Q S L S G G Q Q Q R			spr0728
120	L G M E L L E K V G L A D K - A N A N P D S L S G G Q K Q R			spr1121
113	K A S G L L E Q L G L G G H - A E A Y P F S L S G G Q K Q R			spr1354
	160	170	180	
150	V A I A R A L S M N P D A I L F D E P T S A L D P E M V G E			spr0408
10	I A I A R G L A M H P E L L L F D E P T S A L D P E T I G D			spr0535
129				spr0536
149	V A I V R A L L M H P E I I L F D E V T A S L D P E M V R E			spr0622
149	I A I A R G L A M E P D V L L F D E P T S A L D P E M V G E			spr0728
149	V A I A R G L A M N P D I M L F D E P T S A L D P E M V G D			spr1121
142	V A L A R A M M I D P E I I G Y D E P T S A L D P E L R L E			spr1354
	190	200	210	
180	V L K I M Q D L A Q E G L T M I V V T H E M E F A R D V S H			spr0408
40	V L A V M Q K L A H D G M N M I I V T H E M G F A R E V A D			spr0535
129				spr0536
179	V L E L I N D L A Q E G R T M I L V T H E M Q F A Q A I A D			spr0622
179	V L A V M Q D L A K S G M T M V I V T H E M G F A R E V A D			spr0728
179	V L N V M K E L A E Q G M T M I I V T H E M G F A R Q V A N			spr1121
172	V E K L I L Q N R E L G M T Q I V V T H D L Q F A E N I A D			spr1354
	220	230	240	
210	R V I F M D K G V I A E E G K - P E D L F T N P K E D R T K			spr0408
70	R I I F M A D G E V L V D T T D V D N F F D N P S E P R A Q			spr0535
129				spr0536
209	Q I I F L D Q G K I A E E G T - A Q A F F T N P Q T K R A Q			spr0622
209	R V I F M A D G V V V E D G T - P E Q I F E Q T Q E Q R T K			spr0728
209	R V I F T A D G E F L E D G T - P D Q I F D N P Q H F R L K			spr1121
202	V L L K V E P K			spr1354
	250			
239	E F L Q R Y L K			spr0408
100	Q F L S K I I N H E S D K V K			spr0535
129				spr0536
238	E F L N V F D F S Q F G S Y L			spr0622
238	D F L R K V L			spr0728
238	E F L D K V L N V			spr1121
209				spr1354

Abbildung 3.19: Sequenzvergleich der sieben im Genom von *S. pneumoniae* D39 annotierten *glnQ*-Gene

3.6 Analyse von *glnQ* (spr0408)

Das Protein spr0408 (*glnQ*) war das einzige differenziell auftretende Protein beim Vergleich des Proteoms von *S. pneumoniae* D39 und der isogenen *pavA*-Mutante PN28, das mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden konnte. Es wurde im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom detektiert. Es ist eines von sieben im Genom von *S. pneumoniae* R6 annotierten Genen, die für die ATP-bindende Domäne eines ABC-Glutamintransporters kodieren. Die Inaktivierung von PavA übt demnach einen Einfluss auf die Produktion oder Translokation von spr0408 aus. Drei weitere ATP-bindende Domänen von ABC-Glutamintransportern wurden im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom identifiziert. Diese Genprodukte unterlagen keiner nachweisbaren Regulation von PavA: spr0728, spr1121 und spr1354. Im Folgenden wurde das Protein spr0408 genauer charakterisiert und analysiert. Aufgrund der detektierten Peptide in der MALDI-TOF-MS konnte das zugehörige offene Leseraster (ORF-open reading frame) in der translatierten Genomdatenbank von *S. pneumoniae* gefunden werden.

3.6.1 Analyse des Genlokus von *glnQ* (spr0408)

Die kodierende Nukleotidsequenz von *glnQ* umfasst 741 Basenpaaren. Das vor *glnQ* (spr0408) liegende Gen *glnH* (spr0409) kodiert für die membrandurchspannende Domäne des ABC-Glutamintransporters. Das letzte Basenpaar von *glnH* (spr0409) war gleichzeitig das erste Basenpaar von *glnQ* (spr0408). Die beiden Gene überschneiden sich mit einem Basenpaar. Weitere 765 bp strangaufwärts des Gens *glnH* (spr0409) liegt das Gen *spr0410*, welches für ein hypothetisches Protein kodiert. Das von *glnQ* (spr0408) 109 bp strangabwärts liegende Gen *spr0407* kodiert ebenfalls für ein hypothetisches Protein.



Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der Region um *glnQ* (spr0408) im Genom von *S. pneumoniae* R6

3.6.2 Southern Blot Analyse

Die Übereinstimmung des identifizierten *glnQ*-Genprodukts spr0408 mit den anderen *glnQ*-Genprodukten liegt zwischen 42 %-56 %. Des weiteren sind im Genom von *S. pneumoniae* R6 vier annotierte *glnH*-Gene vorhanden. Davon liegt eins in Nachbarschaft von *glnQ* (spr0408). Die Überprüfung der Sequenzspezifität von *glnQ* (spr0408) und *glnH* (spr0409) erfolgte über Southern Blot Analyse. Dafür wurde die chromosomale DNA von *S. pneumoniae* D39, TIGR4 und einem Serotyp 35A (P37) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut und mit spezifischen Sonden für die Gene *glnQ* (spr0408) und *glnH* (spr0409) hybridisiert.

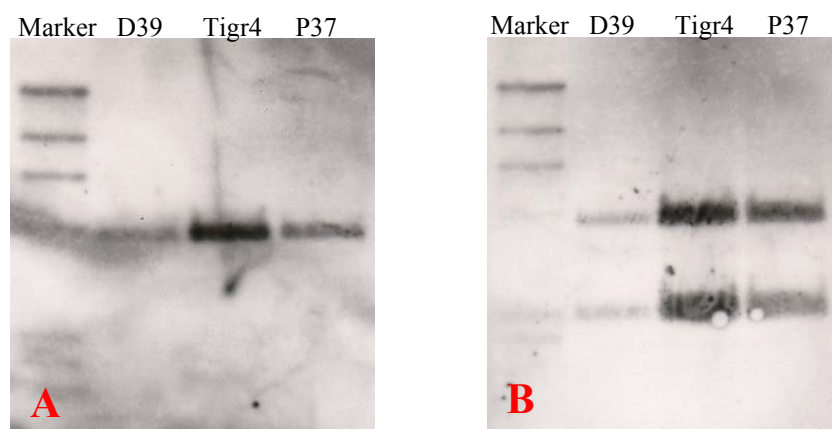


Abbildung 3.21: Southern Blot Analyse mit spezifischen Sonden für *glnQ* (A) und *glnH* (B)

Die Hybridisierung mit der *glnQ*-(spr0408)-Sonde ergab eine einzelne Bande und die Hybridisierung mit der *glnH*-(spr0409)-Sonde zwei Banden im verdauten Genom der verschiedenen Stämme. In der Sequenz von *glnQ* (spr0408) war kein Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym *Hind*III vorhanden, daher sollte bei Sequenzspezifität des Gens auch nur eine Bande reagieren. In der Sequenz von *glnH* (spr0409) war dagegen eine Erkennungssequenz für das Enzym *Hind*III vorhanden, daher wurde durch die Detektion von zwei Banden die Sequenzspezifität der verwendeten *glnH*-(spr0409)-DNA-Sonde bewiesen.

3.6.3 Analyse der Aminosäuresequenz von spr0408

Das Protein GlnQ (spr0408) umfasst 246 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht liegt bei 27 873 kDa und der isoelektrische Punkt bei 5,14. Es wurde ein Motiv in der Sequenz von GlnQ (spr0408) detektiert, das spezifisch für Proteine der ABC Transporter Familie ist.

MTQAILEIKHLKKSYPQNEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL
ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV
AQTTLVKRERTEAEKIAKENLEKVGMGERYWQAKPKQLSGGQKQKQVAIA
RALSMNPDAILFDEPTSAIDPEMVGEVLKIMQDLAQEGLTMIVVTHEMEF
ARDVSHRVIFMDKGVIAEEGKPEDLFTNPKEDRTKEFLQRYLK

Abbildung 3.22: Sequenz von spr0408 mit Markierung der ABC Transporter Familien Signatur (rot).

Ein Homologievergleich mit BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) ergab zahlreiche Übereinstimmungen mit ATP-bindenden ABC-Transporter Domänen anderer Streptokokken-Spezies. Eine Spezies Übereinstimmung von 84 % konnte mit dem Protein SAG0135 aus *S. agalactiae* und dem Protein stu0158 aus *S. thermophilus* gezeigt werden. Das Protein SMU.241.c aus *S. mutans* wies 83 % Homologie und das Protein M6_Spy0267 aus *S. pyogenes* 80 % Homologien zu GlnQ (spr0408) von *S. pneumoniae* auf.

		10	20	30	40	
					
spr0408	-----	MTQAILEIKHLKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	17	
SAG0135	-----	MTQAILEIKHLKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	17	
stu0158	-----	MTEITILEIKNLKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	17	
SMU.241.c	-----	MTDIILEIDHLKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	17	
M6Spy0267	-----	MNAVSMPIITPLEQTKCRLRRSQMSNSIIEIKNLKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	40	
SAG1467	-----	MAELKIDVQDLHKKSYPQ	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	17	
		50	60	70	80	
					
spr0408	-----	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	57		
SAG0135	-----	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	57		
stu0158	-----	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	57		
SMU.241.c	-----	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTFLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	57		
M6Spy0267	-----	NEVLKDISLTVHKGEVISIIGSSSGSGKSTLLRSINLL	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	80		
SAG1467	-----	NEVLKGIDAKFYEGDVVCIIGPSGSGKSTFLRTLNLLESI	ETPTDGQILYHGQNVLEKGYDLTQYREKLGVMVFQSFNLFENLVLENTIV	57		

	90	100	110	120	
				
spr0408	TDGQILYH	QNVLEKGYDLTQYREKL	GMVFQSFNLFENLN		97
SAG0135	SGGEILYH	GHNVLEKGYDLNNYREKL	GMVFQSFNLFENLN		97
stu0158	SGGEILYH	GDNVLEKGYDLTTYRERL	GMVFQSFNLFENLN		97
SMU.241.c	TGGKILYR	GQNVLEKGYDLTKYREN	LGMVFQSFNLFNNLN		97
M6Spy0267	SAGQILFH	GEDVLAEHYNLTHYREKL	GMVFQSFNLFENLN	120	
SAG1467	TSGKVVVD	GFELSNPKTDIDKAREN	IGMVFQHFNLFPHMS	97	
	130	140	150	160	
				
spr0408	VLENTIVA	QTTVLKRERTEAEKIAKEN	LEKVGMGERYWQA		137
SAG0135	ILENAIVA	QTTVLKRERQEAKEIAKEN	LNAVGMTEQYWKA		137
stu0158	VLENAIVA	QTTVLKRDRKEAESIAKAN	LEKVGMGQYWKQA		137
SMU.241.c	VLENAIVA	QTTVLKRNRTAEKIAKDNL	NKVGMTQYWKQA		137
M6Spy0267	VLENAIVA	QTTVLKRDRAQAEQIAKEN	LNAVGMTEQYWQA	160	
SAG1467	VLENITFA	PIELGKESKEAAEKHGMEL	LEKVGGLADK-ANA	136	
	170	180	190	200	
				
spr0408	KPKQLSGG	QKQRVAIARALSMNPDAIL	FDEPTSALDPEMV		177
SAG0135	KPKQLSGG	QKQRVAIARALSVNPEAIL	FDEPTSALDPEMV		177
stu0158	KPKQLSGG	QKQRVAIARALSDPEAIL	FDEPTSALDPEMV		177
SMU.241.c	KPSQLSGG	QKQRVAIARALSVNPEAIL	FDEPTSALDPEMV		177
M6Spy0267	KPKQLSGG	QKQRVAIARALSVNPEAML	FDEPTSALDPEMV	200	
SAG1467	KPDSLSSG	GQKQRVAIARSLAMNPDILL	FDEPTSALDPEMV	176	
	210	220	230	240	
				
spr0408	GEVLKIMQ	DLAQEGLTMIVVTHEMEFAR	DVSHRVIFMDKG		217
SAG0135	GEVLKTMQ	DLAKSGLTMIIVTHEMEFAKE	VSDRVIFMDKG		217
stu0158	GEVLKTMQ	ELSGTGLTMIIVTHEMEFAR	DVSDRVIFMDKG		217
SMU.241.c	GEVLKTIK	DLAKSGLTMLVVTHEMDFAR	DVSDRVIFMDQG		217
M6Spy0267	GEVLKTMQ	DLAKSGLTMIIVTHEMEFAR	DVSDRIIFMDKG	240	
SAG1467	GDVLNVMK	DLAEQGMTMLIVTHEMGFAR	QVANRVIFTTDGG	216	
	250	260	270		
				
spr0408	VIAEEGKP	EDLFTNPKEDRTKEFLQRYLK-		246	
SAG0135	IIAEQGTP	KQLFENPTQERTKEFLQRFK-		246	
stu0158	VIAEQGSPE	QIFENPKEERTKEFLKRFLG-		246	
SMU.241.c	VIAESGKPE	QIFENPQEERTKVFLQRFK-		246	
M6Spy0267	LIAEEGSP	QQIFENPTQDRTKEFLQRFK-		269	
SAG1467	RFLEDGTP	EQIFDTPQHPRLQDFLNKVLNV		246	

Abbildung 3.23: Sequenzvergleich von GlnQ (spr0408) von *S. pneumoniae* mit den ATP-bindenden ABC-Transporter Domänen SAG0135 und SAG1467 aus *S. agalactiae*, stu0158 aus *S. thermophilus*, SMU.241.c aus *S. mutans* und M6_Spy0267 aus *S. pyogenes*. Das Motiv der ABC Transporter Familie ist über den Sequenzen rot markiert.

Für das GlnQ (SAG1467) von Gruppe B Streptokokken (GBS) wurde neben der eigentlichen Funktion als ATP-bindenden Domäne des ABC-Glutamintransporters ein Einfluss auf die Virulenz von GBS beschrieben (Tamura *et al.*, 2002). GBS binden an immobilisiertes Fibronektin. GBS verlieren diese Bindungseigenschaft zu über 90% bei der Inaktivierung von GlnQ. Bei Infektionsstudien in der Maus konnte eine verminderte Virulenz nach der Inaktivierung von GlnQ in GBS festgestellt werden. In GBS ist nur ein GlnQ annotiert. Die Homologien zwischen GlnQ (SAG1467) und GlnQ (spr0408) betragen 53 %. Eine größere Homologie besteht zwischen GlnQ (SAG1467) und einem anderen GlnQ (spr1121) aus *S. pneumoniae* mit 81 % homologen Sequenzbereichen.

3.6.4 Klonierung von glnQ (spr0408)

Damit das Protein GlnQ (spr0408) für weitere Analysen in größerer Menge und in aufgereinigter Form verfügbar wurde, erfolgte die Klonierung des zugehörigen Gens *glnQ* in den Expressionsvektor pQE-30. Bei der Transkription und nachfolgenden Translation der in den Expressionsvektors integrierten *glnQ* (spr0408) DNA-Sequenz wurden sechs Histidine aminoterminal an *glnQ* (spr0408) angefügt. Der Genabschnitt *glnQ* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *DAB1 for* und *DAB2 rev* amplifiziert. Das Amplifikat war 723 bp groß und beinhaltet die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III. Es erfolgte eine Subklonierung über den Vektor pCR2.1 bevor der Genabschnitt über die Restriktionsschnittstellen in den Vektor pQE-30 kloniert wurde. Die Aufreinigung des Genprodukts erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose.

3.6.5 Produktion und Aufreinigung des Proteins GlnQ (spr0408)

Die Produktion von GlnQ (spr0408) erfolgte in *E. coli* M15. Nach der Sedimentation der Bakterien erfolgte der Zellaufschluss mit der French Press und die Aufreinigung des Genprodukts über eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose. Bei der nativen Aufreinigung mit Imidazol lag die Ausbeute bei wenigen µg (~ 10 µg/ml). Dagegen führte die denaturierende Aufreinigung mit 4 M Harnstoff zu ausreichenden Mengen des rekombinanten Proteins im Eluat (~ 400 µg/ml). Eine Reinigung von nativen Protein GlnQ mittels Affinitätschromatographie ist unter den verwendeten Bedingungen kaum möglich..

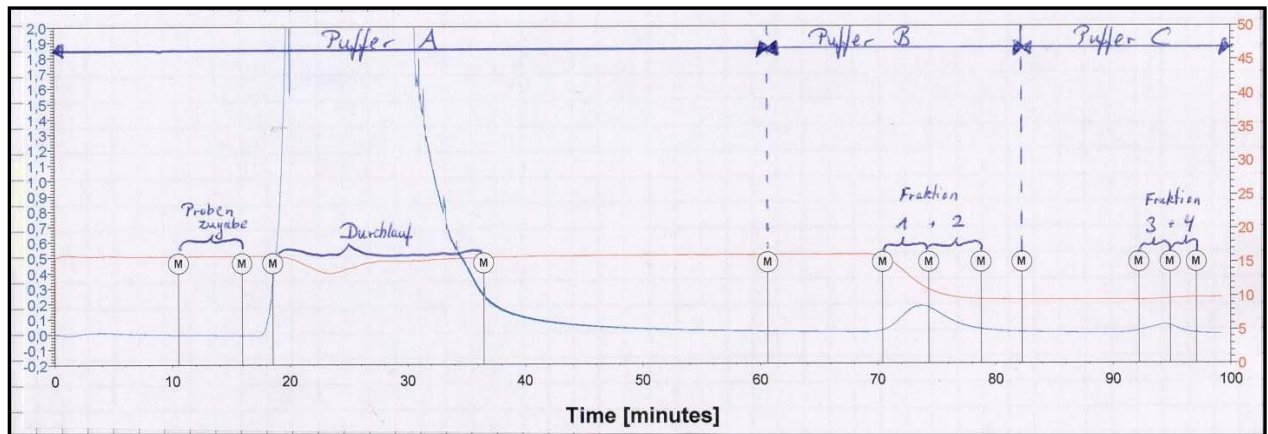


Abbildung 3.24: Chromatogramm der denaturierenden Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des His-Tag markierten Proteins spr0408. Die Aufreinigung wurde über die optische Dichte bei 280 nm (blau) und die Leitfähigkeit (rot) des Eluats beobachtet.

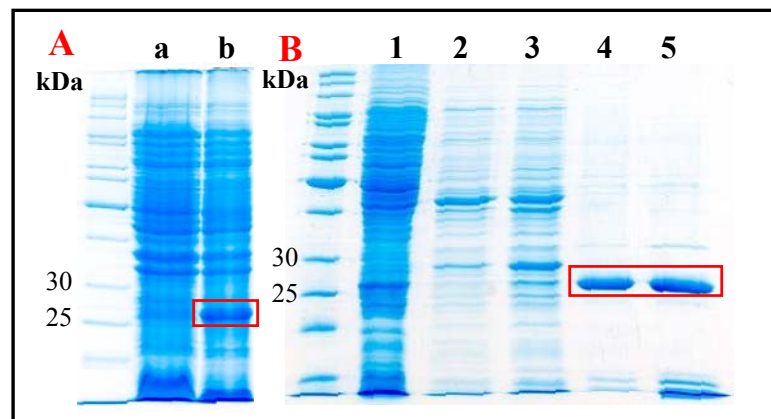


Abbildung 3.25: *E. coli* M15 Proteinlysate vor (a) und nach (b) der Induktion der GlnQ-(spr0408)-Produktion mit IPTG (A). Dargestellt sind der Durchlauf (1) nach Zugabe des Gesamtproteins auf die Ni-NTA-Säule, zwei Fraktionen (2+3) während des Waschens der Säule und zwei Fraktionen während der Elution (4+5). Das rekombinante und gereinigte Protein GlnQ (spr0408) ist in der Spur 4 und 5 aufgetragen (rote Markierung).

3.6.6 Immunblot Analyse von GlnQ (spr0408)

Für Gruppe B Streptokokken wurde bei Inaktivierung von *glnQ* (SAG1476) eine 90 %ige Verringerung der Bindung an Fibronectin und eine Verringerung der Virulenz in der Maus beschrieben (Tamura *et al*, 2002). Daher wurden Immunblots bzw. Western-Blot-Analysen mit dem aufgereinigten GlnQ (spr0408) von *S. pneumoniae* durchgeführt. Es wurde die Bindung von Fibronectin an GlnQ (spr0408) und die Immunogenität des Proteins durch Verwendung von konvaleszentem Patientenserum getestet.



Abbildung 3.26: Immunblot des aufgereinigten rekombinanten Proteins GlnQ (spr408) von *S. pneumoniae* mit konvaleszentem Patientenserum (A) und mit Antikörpern gegen Fibronectin nach Inkubation mit Fibronectin (B).

In der Western-Blot-Analyse konnte keine Bindung von Fibronectin an GlnQ (spr0408) von *S. pneumoniae* nachgewiesen werden. Im konvaleszentem Patientenserum waren dagegen Antikörper gegen GlnQ (spr0408) enthalten. Mit dem konvaleszentem Patientenserum 28.S wurde eine schwache Reaktion mit GlnQ (spr0408) detektiert. Dieses Serum reagiert stark mit immunogenen Proteinen von *S. pneumoniae* wie PspA als auch SpsA (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse zeigen, dass GlnQ (spr0408) immunogen ist, die Reaktivität aber im Vergleich zu anderen immunogenen Proteinen eher als schwach einzuordnen ist.

3.6.7 Konstruktion einer *S. pneumoniae* D39 *glnQ*-Insertions-Mutante

Der Einfluss der Inaktivierung des *glnQ*-(spr0408)-Gens auf die Virulenz von *S. pneumoniae* sollte durch die Konstruktion einer *glnQ*-(spr0408)-Mutante untersucht werden. Die am 3'-Ende verlängerte Sequenz des *glnQ*-(spr0408)-Gens wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *promo-dab-for* und *DAB2 rev* amplifiziert. Das Amplifikat war 1214 bp groß und beinhaltete die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III. Es erfolgte eine Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pCR2.1, bevor der Genabschnitt über die Restriktionsschnittstellen in den Vektor pQE-30 kloniert wurde. Die Oligonukleotide *mut-green-forw* und *mut-rot-rev* hybridisierten innerhalb der *glnQ*-Sequenz und das 3'- und 5'-Ende des Genabschnitts inklusive des gesamten Vektor pQE-30 wurden amplifiziert. Das Amplifikat hatte eine Größe von 4,5 kb und wurde nach Restriktionsverdau mit *Sma*I religiert. Diese Schnittstellen wurden in der PCR mit den Oligonukleotiden eingeführt. Nach Linearisierung mit *Sma*I und einer T4-Polymerase Reaktion wurde die Spectinomycin-Kassette in einer Blunt-end Reaktion in das Plasmid ligiert. Nur ein Sequenzfragment von 143 bp des *glnQ*-Gens wurde nicht amplifiziert und ist damit in der *glnQ*-(spr0408)-Mutante deletiert. Es erfolgte eine Transformation in *E. coli* DH5 α . Nach der Isolierung und Aufreinigung des Plasmids erfolgte die Transformation in *S. pneumoniae* D39. Durch homologe Rekombination wurde das GlnQ (spr0408) mutiert.

3.6.8 Virulenzstudien der *glnQ*-(spr0408)-Mutante im Sepsismodell der Maus

Die Virulenz der *glnQ*-Insertions-Mutante wurde im Sepsismodell der Maus untersucht. Dazu wurden weibliche Balb/c Mäuse mit der *glnQ*-Mutante oder dem Wildtyp *S. pneumoniae* D39 intraperitoneal infiziert. Die Infektionsdosis betrug 1×10^5 Bakterien pro Maus. Die Überlebensrate der Mäuse in den Tagen nach der Infektion wurde beobachtet. Im Kaplan-Meier Plot (Abb. 3.27) wurden die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Nach drei Tagen waren sowohl die Mäuse der Gruppe, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, als auch die Mäuse der Gruppe, die mit der *glnQ*-Mutante infiziert wurden, gestorben. Die Inaktivierung des *glnQ*-Gens, welches für das Protein GlnQ (spr0408) kodiert, hat unter den in diesen Versuch gewählten Bedingungen nur einen geringfügigen Einfluss auf die Virulenz von *S. pneumoniae*.

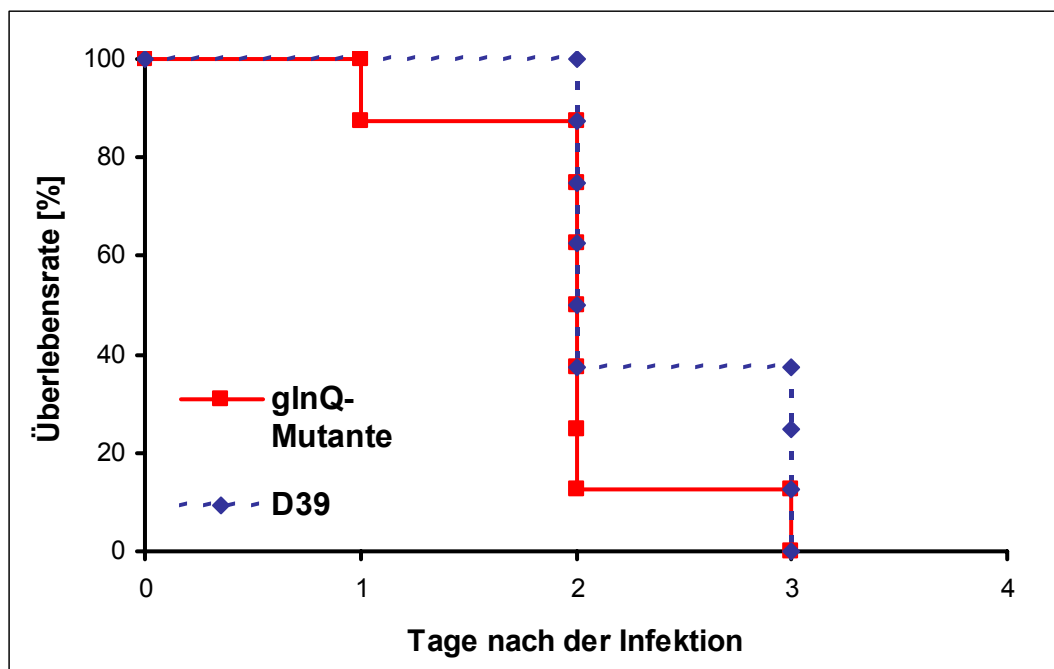


Abbildung 3.27: Überlebensrate der Balb/c Mäuse, die mit dem Wildtyp *S. pneumoniae* D39 oder der isogenen *glnQ*-Mutante infiziert wurde

3.7 Immunologische Untersuchungen

Die Proteine von *S. pneumoniae* sollten auf ihre Antigenität untersucht werden. Da viele antigene Proteine an der Oberfläche von pathogene Organismen lokalisiert sind, wurde zur Durchführung der Versuche das mittels 2D-GE aufgetrennte Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom verwendet. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und ein Immunblot mit konvaleszentem Serum 28.S von einem Patienten, der eine Pneumokokken-Erkrankung hatte, durchgeführt. Die Muster der Immunblots unterschieden sich allerdings stark von den Expressionsprofilen der RUBPS gefärbten Gele. Die Antikörper im Patientenserum erkannten nur spezifische Proteine, wodurch stark divergierendes Muster entstand. Die Divergenz wurde durch die höhere Sensitivität der immunologischen Nachweisreaktion verstärkt.

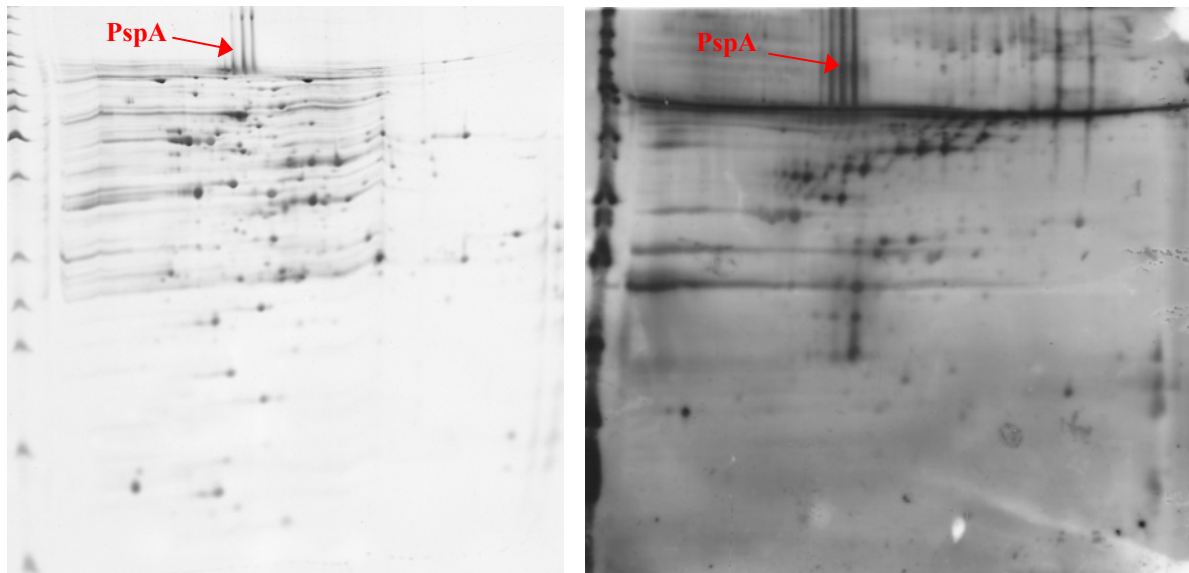


Abbildung 3.28: Vergleich eines RUBPS-gefärbten 2-DE-Gels und eines 2-DE-Immunoblots mit konvaleszenten Patientenserum von dem Subproteom der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine von *S. pneumoniae* D39

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wurde beim Immunblot im hochmolekularen Bereich viele Proteine detektiert, die im RUBPS-gefärbten Expressionsprofil des Subproteoms nicht erfasst werden konnten. Auch im mittleren Bereich unterscheidet sich die detektierten Muster stark voneinander. Diese Divergenz resultierte in eine zur Zeit nicht eindeutigen Zuordnung der Proteine. Lediglich das Protein PspA konnte Aufgrund des signifikanten Spotmusters zugeordnet werden.

4. Diskussion

Streptococcus pneumoniae kolonisiert als ein natürlicher Bewohner die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts beim Menschen. Gleichzeitig ist *S. pneumoniae* auch ein bedeutender humanpathogener Erreger, der Erkrankungen wie Mittelohrentzündung, Lungenentzündung und Sepsis bis hin zur Meningitis verursachen kann (AlonsoDe Velasco *et al.*, 1995). Die Faktoren und Mechanismen, die in der Pathogenese von *S. pneumoniae* eine Rolle spielen sind nur unzureichend aufgeklärt. Für das Verständnis der Vorgänge in Pneumokokken wurde in dieser Arbeit das Proteom analysiert. Das Proteom liefert detaillierte Informationen über die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene Proteinausstattung unter definierten Bedingungen. In der vergleichenden Proteomanalyse einer in der Virulenz reduzierten *pavA*-Mutante von *S. pneumoniae* D39 und dem Wildtyp *S. pneumoniae* D39 wurde untersucht, ob PavA direkt oder indirekt die Proteinexpression moduliert. Diese Proteine sind für das Verständnis der Pneumokokken-Pathogenese von besonderem Interesse, da sie potenziell zur Virulenz von *S. pneumoniae* beitragen.

4.1 Methoden-Etablierung

Die Grundlage für die Durchführung einer Proteomanalyse bildet die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE). Sie ist eine aufwendige und zeitintensive Methode für die eine individuelle Adaption der Probenmaterialien auf die untersuchten Fragestellungen notwendig ist. Dennoch ist die 2D-GE bislang die geeignetste Methode, um komplexe Proteingemische hochauflösend darzustellen. Limitationen ergeben sich im Bereich der hydrophoben und basischen Proteine, wie es bei Membranproteinen der Fall ist. Die Detektion von Proteinen geringer Konzentrationen wird ermöglicht durch Reduktion der Probenkomplexität nach einer Fraktionierung des Proteoms.

Für die Aufgabenstellung in dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Proteinextraktionen etabliert und auf ihre Eignung geprüft. Es handelte sich um eine präzipitationsbasierte Proteinextraktion mit einer Aufteilung des Proteoms in zwei Subproteome und eine fraktionierte Proteinextraktion mit einer Aufteilung des Proteoms in drei Subproteome. Außerdem wurde die Anreicherung und Darstellung des Sekretoms in der 2D-GE erarbeitet. Für die präzipitationsbasierte Probenaufarbeitung wurden verschiedene Proteinfällungen getestet. Basierend auf einer TCA/Aceton-Fällung konnten mit dieser Methode sehr klare und scharf separierte Expressionsprofile von *S. pneumoniae* D39 erstellt werden. Der Vorteil einer

vorgeschalteten Proteinfällung lag in der erhöhten Reinheit der Probe, so dass kaum andere bakterielle Bestandteile einen negativen Einfluss auf die isoelektrische Fokussierung (IEF) haben konnten. Der Nachteil lag in den auftretenden Proteinverlusten, die bei jeder Fällungsmethode auftreten. Daher wurde eine weitere Probenaufarbeitung etabliert, die eine direkte Extraktion der Proteine aus den Bakterien ermöglichte. Die Etablierung dieser Methode zeigte, dass bei direkter Proteinextraktion die Nukleinsäuren den Hauptstörfaktor in der IEF darstellten. Bei der Auswertung der Expressionsprofile nach der fraktionierten Proteinextraktion erhöhte sich die Anzahl der visualisierten Proteine geringfügig um 46 Spots. Im Subproteom der zytoplasmatischen Proteine konnten zwar 133 Spots mehr detektiert als bei den Expressionsprofilen der präzipitationsbasierten Proteinextraktion. Die Anzahl der im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom detektierten Spots bei der fraktionierten Proteinextraktion verringerte sich auf 116. Das Membran- bzw. Zellwand-assoziierte Subproteom zeigte bei der fraktionierten Proteinextraktion eine schlechtere Auflösung im Expressionsprofil durch horizontale Streifenbildung während der IEF. Verunreinigungen der Proteinprobe durch beispielsweise Kapselpolysaccharide können die Qualität der IEF herabsetzen. Bei der vergleichenden Proteomanalyse von *S. pneumoniae* D39 mit der isogenen *pavA*-Mutante auf der Grundlage der präzipitationsbasierten Proteinextraktion wurden keine differentiell produzierten Proteine detektiert. Der Vergleich von *S. pneumoniae* D39 mit der isogenen *pavA*-Mutante auf der Grundlage der fraktionierten Proteinextraktion ergab differentielle Expressionsunterschiede. Beide Extraktionsmethoden sind geeignet für die Erstellung von Mastergelen von *S. pneumoniae*. Für eine vergleichende Proteomanalyse überwiegen die Vorteile der fraktionierten Proteinextraktion. Für die Aufgabenstellung dieser Arbeit wurde daher die fraktionierte Proteinextraktion verwendet.

Bei der Auswahl der geeigneten Proteinfärbemethode war neben Sensitivität und Quantifizierbarkeit, auch die Kompatibilität mit massenspektroskopischen (MS) Analysen zu beachten. Die Quantifizierbarkeit der Proteinmengen ist von Bedeutung für die Durchführbarkeit von vergleichenden Proteomanalysen. Die hohe Sensitivität der Silberfärbung ermöglicht die Detektion von weniger als 1 ng Protein. Sie ist jedoch nicht quantifizierbar und nicht geeignet für anschließende MS-Analysen der Proteine. Die Coomassie-Färbung ist kompatibel mit der MS und ermöglicht Quantifikation bei Proteinkonzentrationen von 5 ng bis 2000 ng. Die Nachweisgrenze von kolloidalen Coomassie liegt bei 5 ng Protein. Kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich für anschließende MS-Analysen und weisen eine Nachweisgrenze von 2 ng Protein auf, sind aber sehr teuer. Nach einem Protokoll von *Rabilloud* wurde der Fluoreszenzfarbstoff RuBPS in eigener Herstellung

synthetisiert. Die Nachweisgrenze von RuBPS liegt bei 2 ng Protein. Die RuBPS-Färbung war kompatibel mit MS-Analysen und ermöglichte eine Quantifizierung im Proteinbereich von 2 ng – 2000 ng. Die RuBPS-Färbung und die Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie wurden daher bevorzugt angewendet. Für die Zukunft ist die Entwicklung sensitiverer Farbstoffe für den Einsatz in der 2D-GE wünschenswert.

4.2 Mastergele von *S. pneumoniae* D39

Die Genome von vier verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen sind bereits entschlüsselt und darauf basierend sind für *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 theoretische 2D-Gele erstellt worden (www.tigr.org). Eine umfassende Untersuchung in der experimentellen Proteomanalyse von *S. pneumoniae* wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Die grundsätzliche Protein-Ausstattung eines Mikroorganismus bei optimalen Wachstum ist für jede Art spezifisch. Die Erstellung der Mastergele von *S. pneumoniae* bei optimalem exponentiellen Wachstum bildet die Grundlage für vergleichende Untersuchungen bei verschiedenen Bedingungen. Die Mastergele stellen das Bezugsproteom dar und geben gleichzeitig Auskunft über Ort, Menge und Modifikationen produzierter Proteine.

In Abbildung 2.3 ist am Beispiel von *S. pneumoniae* R6 ein typisches theoretisch errechnetes Proteom dargestellt. Auffallend daran ist das geringe Auftreten von Proteinen im neutralen pH-Bereich. Proteine neigen bei Erreichen eines pH-Wertes, der ihrem isoelektrischen Punkt (IP) entspricht, zur Präzipitation. Daher ist es für die meisten Organismen sinnvoll, wenige Proteine mit einem IP bei physiologischem pH-Werten zu besitzen. Zur Erstellung der Mastergele wurde ein pH-Bereich von pH 4 bis pH 7 gewählt, da im theoretischen Proteom in diesem pH-Abschnitt die höchste Akkumulation von Proteinen zu erkennen ist.

Für die Erstellung der Mastergele wurden die Daten von je drei Gelen einer Probe zusammengefasst. Die Proteinspots der Gele wurden ausgeschnitten, verdaut und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Von den 2000 analysierten Proteinspots konnten 56 % eindeutig einem annotierten Protein zugeordnet werden. Ursachen für erfolglose MS-Analysen können neben experimentell bedingten Fehlerquellen, wie z. B. der Verlust des ausgeschnittenen Proteins im automatisierten Verfahren, auch in der Natur der nach dem Verdau resultierenden Peptide liegen. Die Driftstrecke, der Ort der eigentliche TOF (time of flight)–Messung hat nur eine bestimmte Länge, daher können sehr kleine oder sehr große Peptide nicht immer erfasst werden. Eine entscheidende Rolle spielt zudem auch die Ionisierbarkeit der Peptide, denn nur

ionisierte Moleküle können im Massenspektrometer beschleunigt und damit analysiert werden. Durch die Aufteilung in Subproteome konnten eine funktionelle Zuordnung der 240 identifizierten, unterschiedlichen Proteine erfolgen

Im zytoplasmatischen Subproteom wurden 208 verschiedene Proteinen identifiziert, davon waren 120 Proteine spezifisch für das Zytoplasma. 22 Proteine waren in die Translation involviert, darunter 11 identifizierte Aminosäure-tRNA-Synthasen wie die Seryl-, Tyrosyl- und Prolyl-tRNA-Synthase. 11 der spezifisch identifizierte Proteine sind in den Kohlenhydrattransport und –Metabolismus involviert. 2 Proteine davon konnten dem Pentose-Phosphatweg (Glukose-6-phosphat-1-dehydrogenase und N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Isomerase) zugeordnet werden. Weitere 20 Zytoplasma-spezifische Proteine gehörten zum Aminosäure-Metabolismus, wie beispielsweise die Aminopeptidasen C und N oder zwei verschiedene Dipeptidasen. Erwartungsgemäß wurden keine Genprodukte des Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) identifiziert. Bei Pneumokokken ist die Umsetzung von Pyruvat zu Kohlendioxid mittels des TCA-Zyklus nicht möglich, da im Genom der Pneumokokken nicht ein einziges der 18 Gene vorhanden ist, das für ein Enzym des TCA-Zyklus kodiert. Auch die Gene, die für Enzyme der Elektronentransportkette kodieren sind nur unvollständig im Genom vorhanden. Pneumokokken sind nicht in der Lage, Energie durch aerobe oder anaerober Atmung zu gewinnen. *S. pneumoniae* betreibt ausschließlich eine rein fermentative Energiegewinnung über die Glykolyse (Hoskins *et al.*, 2001). Bis auf die Glucose Kinase waren die Proteine der Glykolyse nicht spezifisch für das zytoplasmatische Subproteom. Die anderen Glykolyse-Enzyme konnten in allen Subproteomen identifiziert werden. Nur ein Genprodukte der Glykolyse-Gene waren nicht unter den identifizierten Proteinen (Abbildung 4.1). Von der Produktion dieses Enzyms ist jedoch auszugehen, da Glukose die einzige Kohlenhydratquelle des Kulturmediums war. Bislang konnten noch nicht alle detektierten Proteinspots der Expressionsprofile identifiziert werden. Das nicht identifizierte Glykolyse-Enzym gehören mit großer Wahrscheinlichkeit zu dieser Gruppe.

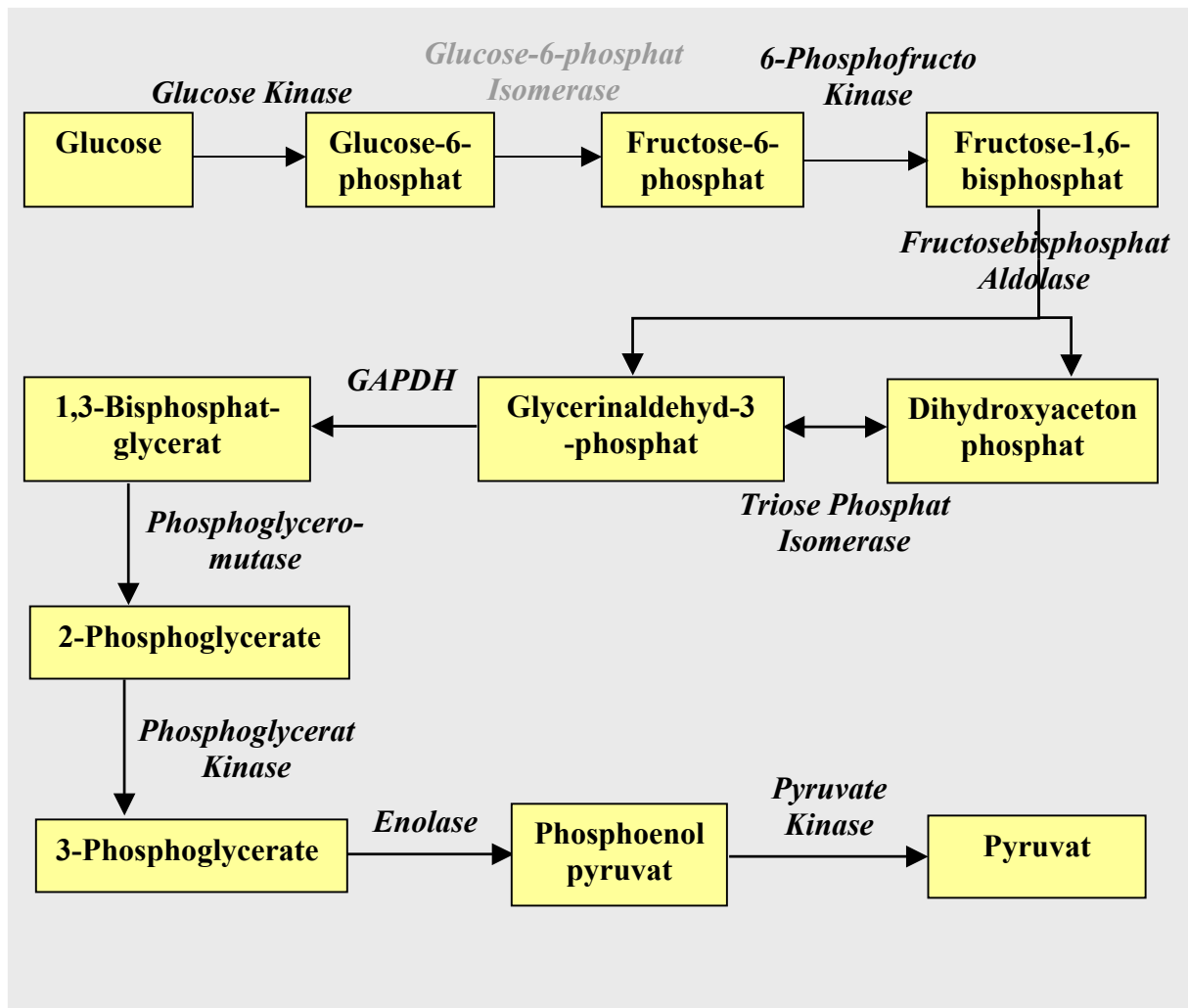


Abbildung 4.1: Schema der Glykolyse. Die im Proteom identifizierten Enzyme sind schwarz.

Pneumokokken besiedeln während der Infektion eines Wirtes verschiedenen Habitats. Die Kolonisierung und Adhäsion an Wirtszellen erfolgt in einer aeroben bis mikroaerophilen Umgebung, nach der Invasion der Wirtszellen und nach Übergang in den Blutstrom herrschen eher anaerobe Bedingungen. Ein Grund für die fehlenden energetisch günstigeren Stoffwechselwege der anaeroben und aeroben Atmungskette, könnte daher in der Unabhängigkeit der Glykolyse vom Sauerstoffgehalt der Umgebung liegen. Dadurch benötigen die Pneumokokken im Lauf der Pathogenese bei der Energiegewinnung keine Adaption ans neue Habitat.

Ein essentieller Schritt im Infektionsprozess bei pathogenen Mikroorganismen wie *S. pneumoniae* ist die Adhärenz des Bakteriums an die Wirtszelle. Dabei spielen die Membran- und Zellwand-assoziierte Proteine eine entscheidende Rolle, da diese aufgrund der exponierten Lage an der Oberfläche des Bakteriums potenziell an der Infektion und insbesondere der Anheftung und Aufnahme in Wirtszellen involviert sind. Des Weiteren sind

Oberflächenproteine potenzielle Kandidaten für Impfstoffe. Zur Isolierung von Oberflächenproteinen von *S. pneumoniae* sind besondere Methoden notwendig, da die Behandlung mit extrahierenden Detergenzien schon über einen kurzen Zeitraum zur Autolyse führte. Vor der eigentlichen Extraktion wurden die Bakterien aufgeschlossen, Zellwand- und Membrantrümmer von der Zytoplasma-Fraktion getrennt und gewaschen. Bei dieser Methode werden nicht nur Membran-assoziierte Proteine der Oberfläche extrahiert, sondern auch im gleichen Maße Membran-assoziierte Proteine, die der zytoplasmatischen Seite zugewandt sind. Im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom wurden 16 Proteine identifiziert, die an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran assoziiert waren. Weiterhin wurden 12 Proteine identifiziert die eine Signalsequenz enthielten. Eine Signalsequenz ist typisch für Oberflächenproteine, da diese die Translokation aus dem Zytoplasma steuert. Es wurden 22 Proteine, die spezifisch für das Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom sind, identifiziert. Die Hälfte dieser Proteine waren ATP-bindende Domänen verschiedener ABC-Transporter für beispielsweise Glutamin, Oligopeptide, Ribose und Galaktose, Maltose und Maltodextrin, Eisen und Phosphat. Insgesamt wurden 20 ATP-bindende Domänen von ABC-Transportern in diesem Subproteom angereichert. In Abbildung 4.2 sind die Transportsysteme markiert aus deren Gruppe einzelne Proteine identifiziert wurden.

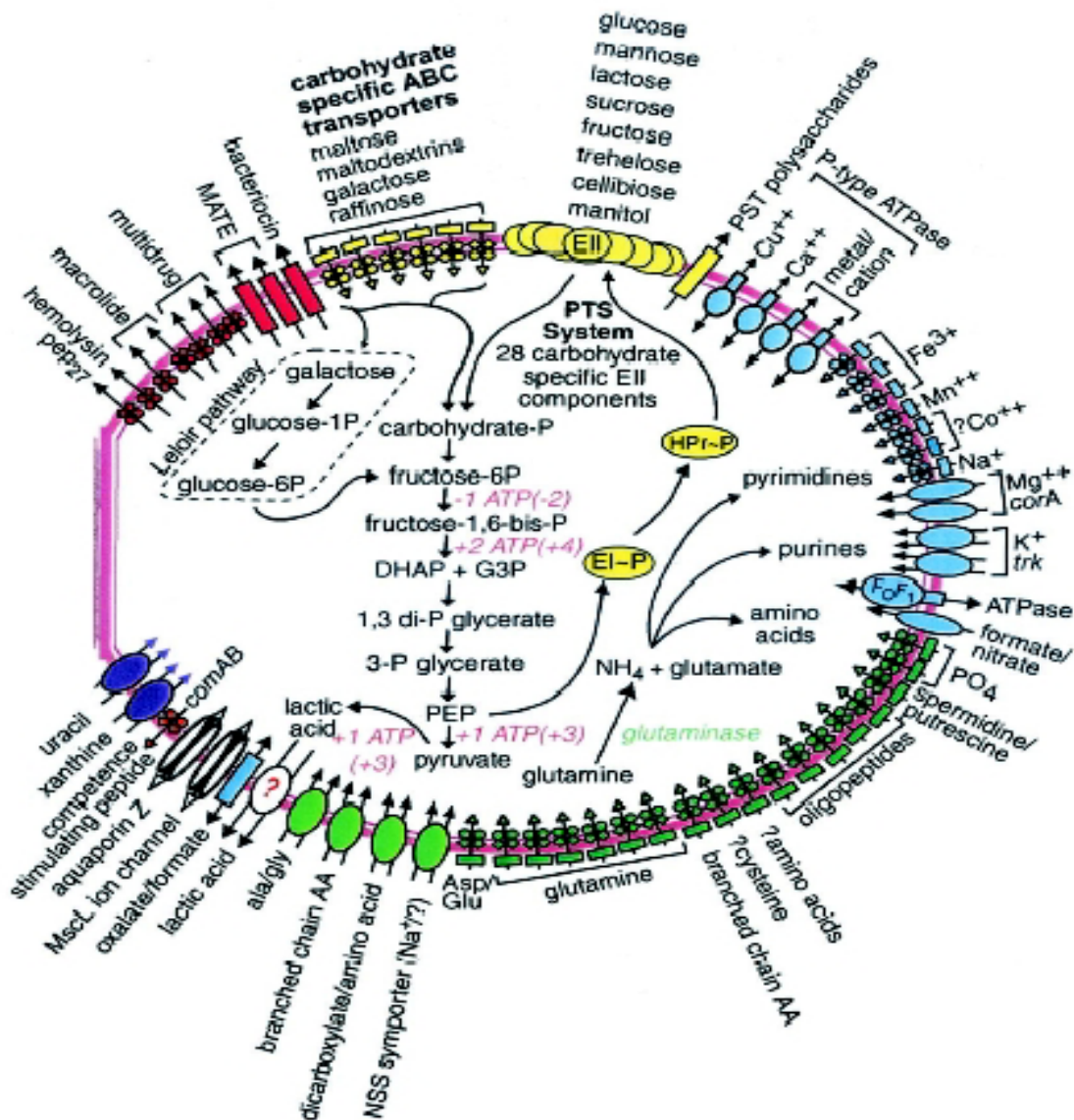


Abbildung 4.2: Darstellung der Transportsysteme von *S. pneumoniae* (Hoskins et al., 2001).

Proteine können durch verschiedene Mechanismen mit der Zelloberfläche verknüpft oder assoziiert sein. Eine kovalente Bindung erfolgt zwischen dem Peptidoglycan und der Zellwand mit einem LPXTG-Motiv des Proteins. Nicht-kovalente Bindungen finden durch C-terminale hydrophobe Wechselwirkungen oder durch die Verankerung von Lipoproteinen über Phospholipidreste in der Zytoplasmamembran statt. Ein bei Pneumokokken spezifischer Mechanismus ist die nicht-kovalente Bindung von Proteinen an das Phosphorylcholin der Teichon- und Lipoteichonsäuren. Im Genom von *S. pneumoniae* R6 wurden 13 Proteinen mit LPXTG-Motiv, 109 Lipoproteine und 10 cholinbindende Proteine annotiert. Im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom konnte kein Protein mit LPXTG-Motiv identifiziert werden. Das Lipoprotein PpmA (**p**neumococcal **p**roteinase **m**aturation **p**rotein A) und das cholinbindende Protein PspA (**p**neumococcal **s**urface **p**rotein **A**) wurden in diesem

Subproteom identifiziert. Für beide ist eine Involvierung in die Virulenz von Pneumokokken beschrieben (McDaniels *et al.*, 1991; Overweg *et al.*, 2000). Eine Ursache für die geringe Detektion von Lipoproteinen, cholinbindenden Proteinen und Proteinen mit LPXTG-Motiv kann neben der geringen Anzahl dieser Proteingruppen, die kovalente Bindung der Kapselpolysaccharide an das Peptidoglycan der Zellwand sein.

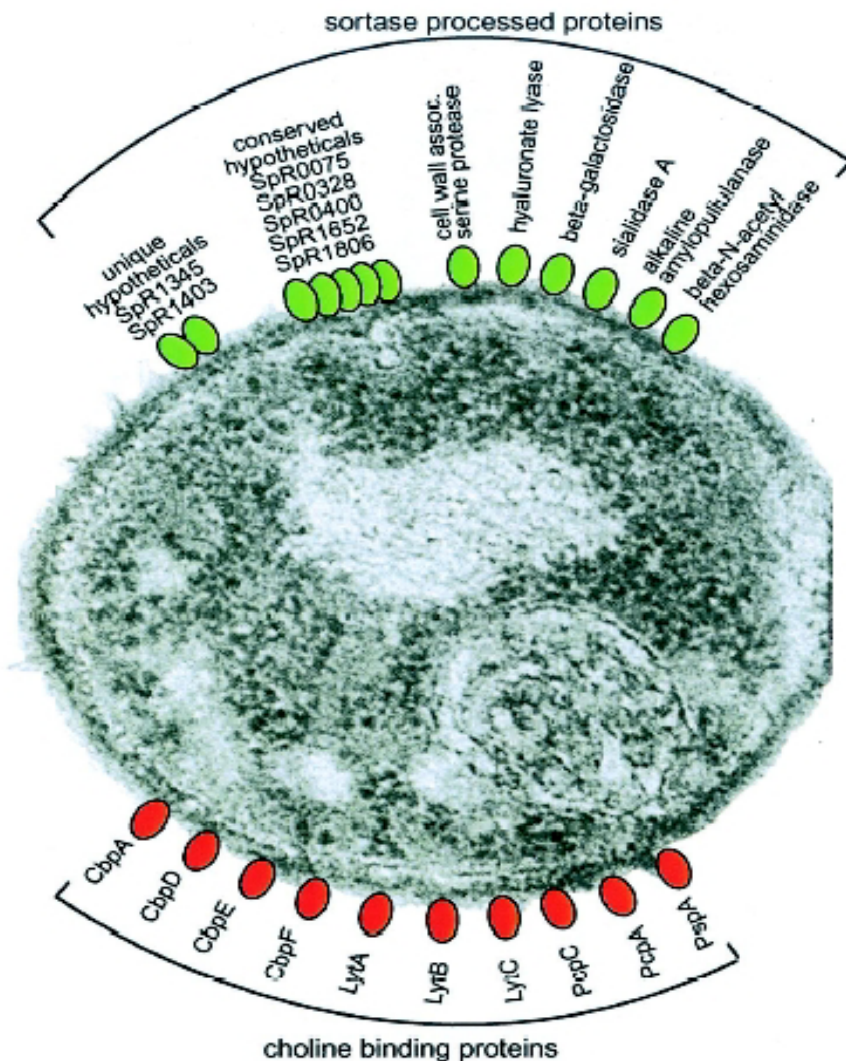


Abbildung 4.3: Übersicht über eine Auswahl Zellwand verankerte Oberflächenproteine (Hoskins *et al.*, 2001)

Im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom wurden weiterhin 59 Proteine mit einer zytoplasmatischen Funktion identifiziert. Die Waschschrte vor der Extraktion der Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine wurden zur Entfernung zytoplasmatischer Verunreinigungen durchgeführt. Ein Indiz für die gründliche Beseitigung dieser

Verunreinigungen, ist das Fehlen der im Zytoplasma dominant auftretenden NADH spezifische Glutamat Dehydrogenase, die im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteom nicht detektiert wurde. Für einige Zytoplasma-Proteine wurde bereits eine Lokalisation auf der Zelloberfläche von *S. pneumoniae* bewiesen. Die Enolase und Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen auf der Zelloberfläche von *S. pneumoniae* mit Plasminogen-bindenden Eigenschaften nachgewiesen. (Bergmann et al., 2001; Bergmann et al. 2004; Pancholi und Fischetti, 1998). Humanes Plasminogen baut nach dessen Aktivierung Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und Kollagen ab. Die Bakterien könnten durch eigene Oberflächenproteine die fibrinolytischen Prozesse des Wirts auslösen, um in das Wirtsgewebe einzudringen. Die Rekrutierung von Zytoplasma-Proteinen wurde auch bei anderen Erregern nachgewiesen. Enolase und GAPDH wurden ebenfalls auf der Zelloberfläche von Gruppe A Streptokokken (Pancholi und Fischetti, 1998), Gruppe B Streptokokken (Hughes *et al.*, 2002) und *Listeria monocytogenes* (Schaumburg et al., 2004) nachgewiesen. Ein Transferrin-bindendes Zellwandprotein mit großen Homologie zu Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase wurde bei Staphylokokken identifiziert (Modun et al., 1999). Bei *L. monocytogenes* wurden ebenfalls die zytosolischen Proteine Elongation Faktor TU und Dnak mit Plasminogen-bindende Eigenschaften auf der Zelloberfläche detektiert (Schaumburg et al., 2004). Dnak ist auch auf der Zelloberfläche von *S. agalactiae* präsent (Hughes *et al.*, 2002). Die Translation Elongation Faktoren TU und TS, die Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase PdhB und die Chaperone GroEL, GroES und das Dnak wurden als starke Antigene beim Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* mit Lokalisation auf der Zelloberfläche identifiziert (Rosenkrands et al., 2000). In Oberflächenextrakten von Pneumokokken wurde ebenfalls das Chaperonin GroEL nachgewiesen (Pancholi und Fischetti, 1998). Ling und Kollegen identifizierten 2004 weitere zytoplasmatische Proteine aus Zellwandextrakten von *S. pneumoniae*, die immunogen mit konvaleszenten Patientenseren reagierten. Darunter waren die Untereinheit der Glutamyl-tRNA Amidotransferase, die L-lactate Dehydrogenase, die Fructose-biphosphate Aldolase, die UDP-glucose-4-epimerase, die Glutamyl-tRNA Synthetase, die Phosphoglycerate Kinase, die Glucose-6-Phosphat Isomerase, die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase, die Aminopeptidase C, das hypothetische Protein spr0489, die Carbamoyl-phosphat Synthase, die Aspartat Carbamoyltransferase und die Pyruvate Oxidase (Ling *et al.*, 2004). Die Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine auf der Zelloberfläche mit der Übernahme zusätzlicher Funktionen und Eigenschaften ist demnach keine

Ausnahmeerscheinung, sondern unter humanpathogenen Erregern verbreitet. Diese sogenannte „moonlightening“ Funktion von zytosolischen Proteinen stellt eine effiziente Nutzung der vorhandenen Gene bzw. Genprodukte dar.

Im Sekretom wurden 65 verschiedene Genprodukte identifiziert von denen nur vier spezifisch in diesem Subproteom auftraten. Dabei handelt es sich um zwei hypothetische Proteine, dem Stressfaktor GSP-781 und der als Virulenzfaktor beschriebenen Zink-Metalloprotease ZmpB (Blue *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte ZmpB nicht in den Membran-assoziierten Subproteomen detektiert werden. ZmpB ist das einzige der identifizierten Proteine, welches ein LPXTG-Motiv enthielt. Es wurde reproduzierbar im Sekretom nachgewiesen. Das Sekretom enthielt überwiegend zytoplasmatische Proteine. Die multifunktionalen Eigenschaften einiger Zytoplasma-Proteine wurden bereits vorgestellt. Viele dieser Proteine konnten im Sekretom nachgewiesen werden, wie beispielsweise die Dnak, die GAPDH, die Enolase und der Translations Elongations Faktor TU. Dennoch kann die spontane Autolyse der Pneumokokken während der frühen exponentiellen Wachstumsphase nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die als multifunktional identifizierten Zytoplasma-Proteine zeichneten sich im zytoplasmatischen Subproteom durch dominante Proteinspots und zum Teil omnipräsentes Auftreten aus. Die Enzyme Enolase, Pyruvat Kinase, Fructosebisphosphat Aldolase, GAPDH und Phosphoglycerat Kinase waren in mehr als einem Proteinspot identifiziert worden. Die Proteine waren meist im isoelektrischen Punkt (IP) verschoben, vermutlich durch posttranslationale Modifikationen.

Zytoplasmatische Proteine besitzen keine Signalsequenzen zur Translokation und keine Motive für die Zellwandverankerung, daher ist Präsenz zytoplasmatischer Proteine im Membran- und Zellwand-assoziierten Subproteom und im Sekretom ungewöhnlich. Die Sekretionsmechanismen Gram-positiven Bakterien sind nur unzureichend geklärt. Ein SecA2-abhängiger Sekretionsmechanismus wurde für *L. monocytogenes* und acht weitere Gram-positive Bakterien beschrieben, dazu zählte auch *S. pneumoniae* (Lenz *et al.*, 2003). Die zentralen Komponente dieses Sekretionssystems sind SecA und SecY (Bensing und Sullam, 2002; Campo *et al.*, 2004; Lenz und Portnoy, 2002). Bisher wurde davon ausgegangen, dass eine Sekretion nur über ein Signalsequenz erfolgen kann. Es wurde aber gezeigt, dass über den sec-Weg auch typische Zytoplasma-Proteine transportiert wurden wie beispielsweise die RNA polymerase β -Untereinheit, die Dnak, die Enolase, der Translations Elongations Faktor TU und das Chaperonin GroEL (Lenz *et al.*, 2003). Eine alternative Möglichkeit

besteht in der Reassoziierung dieser Proteine an die Zelloberfläche nach der Freisetzung durch lysierte Bakterien. Die Reassoziierung an die Pneumokokkenoberfläche konnte für die Enolase bereits gezeigt werden [Bergmann *et al.*, 2001]. Die bei kritischer Zelldichte induzierte Autolyse von *S. pneumoniae* führt zur Freisetzung von multifunktionellen zytoplasmatischen Proteinen, die z.T. als wichtige Virulenzfaktoren in den Infektionsprozess involviert sind. Zu diesen zytoplasmatischen Proteinen zählen das zytotoxische Pneumolysin und auch die Plasminogen-bindende Enolase. Neben den zytoplasmatischen Proteinen werden bei der Autolyse Zellwandfragmente freigesetzt, die starke inflammatorische Reaktionen mit lokalen Gewebeschädigungen hervorrufen können. Die Zellwandfragmente stimulieren die Produktion von Zytokinen und Proteasen und induzieren die Immunantwort. Durch die autolytische Freisetzung bakterieller Komponenten kann die Dissemination der Pneumokokken im Wirt begünstigt werden, während die Stimulation der Immunabwehr den Infektionsverlauf beeinträchtigen kann.

Das Subproteom der schwer löslichen Proteine (MP2) enthielt interessanterweise vorwiegend stark basische ribosomale Proteine. Dennoch wurden auch hier zwei zytoplasmatischen Proteine identifiziert, der Translation Elongation Faktor TU und die Enolase. Diese Proteine besitzen offensichtlich eine hohe Affinität zur Membran oder Zellwand. Die Ursache für die Anreicherung der basischen ribosomalen Proteine ist noch nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche Proteomdaten gesammelt werden, die zur Erstellung von Mastergelen der Subproteome von *S. pneumoniae* genutzt wurden, dabei wurden die Genprodukte von 33 hypothetisch annotierten Proteinen nachgewiesen. Die Mastergele von *S. pneumoniae* bilden die Grundlage für vergleichende Proteomanalysen, die zur Aufklärung der regulatorischen Ereignisse während der Pathogenese von *S. pneumoniae* genutzt werden sollen. Im Laufe der Pathogenese besiedelt *S. pneumoniae* verschiedene Habitate im Wirt, wie die Schleimhaut des oberen Respirationstraktes und bei invasiven Erkrankungen das Blut. Die Anpassung von *S. pneumoniae* an die veränderten Bedingungen in Bezug auf Temperatur, Sauerstoff- und Nährstoffgehalt sollten sich im adaptierten Proteom widerspiegeln. Die Faktoren, die zur Abwehr des wirtseigenen Immunsystems produziert werden und die Faktoren, die zur Überwindung von Gewebebarrieren produziert werden, können über Proteomanalysen erforscht werden.

4.3 Vergleichende Proteomanalyse des *S. pneumoniae* Wildtyps D39 mit der isogenen *S. pneumoniae* Mutante D39 Δ pavA

PavA ist ein Fibronektin-bindendes Oberflächenprotein von *S. pneumoniae* und steht im Zusammenhang mit dessen Adhärenz und Virulenz (Holmes *et al.*, 2001). Infektionsstudien im Sepsis-Modell der Maus zeigten eine Attenuierung der Virulenz der isogenen *pavA*-Mutante. Die Pathogenese von *S. pneumoniae* ist ein dynamischer und komplexer Mechanismus in den zahlreiche Genprodukte involviert sind. Durch die Inaktivierung des *pavA*-Gens wird vermutlich regulatorisch auf andere Genprodukte eingewirkt, die eine Verminderung der Virulenz von *S. pneumoniae* zur Folge haben. Diese Vermutung soll anhand einer vergleichenden Proteomanalyse untersucht werden. Die Inaktivierung des PavA kodierenden Gens von *S. pneumoniae* führte im Proteom zur Induktion eines unidentifizierten neuen Proteinprodukts und zur Repression der ATP-bindenden Domäne des ABC-Glutamintransporters GlnQ (spr0408) im Expressionsprofil der isogenen *pavA*-Mutante. Damit konnte ein regulatorischer Einfluss von PavA bewiesen werden.

4.4 Funktion von GlnQ (spr0408) in der Pathogenität von *S. pneumoniae*

Bakterielle ABC Transporter bestehen in der Regel aus vier Domänen, zwei ATP-bindenden und zwei membrandurchspannenden. Die ATP-bindenden Domänen sind dabei auf der Seite der Zytoplasma-Membran assoziiert. Die Beteiligung von ABC-Transportern in der Virulenz von Pneumokokken wurde bereits für die Transmembran-Domäne PsaA eines ABC-Mangantransporters beschrieben. Im Genom von *S. pneumoniae* R6 sind sieben Gene mit der Bezeichnung *glnQ* annotiert, die sich in ihrer Sequenz stark unterscheiden. Insgesamt sind 22 Gene vorhanden, die für verschiedene Domänen von ABC Glutamintransporter kodieren. Das sind ungefähr 10 % der in Pneumokokken vorhandenen Gene, die für ABC-Transporter kodieren (Hoskins *et al.*, 2001). In Gruppe B Streptokokken (GBS) wurde ein Einfluss von GlnQ auf die Virulenz beschrieben (Tamura *et al.*, 2002). Das Genom von GBS enthält nur ein Gen kodierend für GlnQ. Das von PavA regulierte und in der Proteomanalyse identifizierte GlnQ (spr0408) zeigt eine 53 % Homologie zu dem GlnQ aus GBS. Eine 84 % Homologie besteht mit dem in *S. agalactiae* annotierten hypothetischen Protein gbs0131. Die Inaktivierung des *glnQ*-Gens in GBS führte zu einer verminderten Fibronektin-Bindung (Tamura *et al.*, 2002). Daher wurde das *glnQ*-(spr0408)-Gen von *S. pneumoniae* rekombinant aufgereinigt und die Fibronektin-Bindung getestet. Eine Bindung von GlnQ (spr0408) an Fibronektin konnte nicht nachgewiesen werden. Die immunobiologische Untersuchung von

GlnQ (spr0408) mit konvaleszentem Serum zeigte nur ein schwaches immunogenes Potenzial von GlnQ (spr0408). Der Einfluss von GlnQ (spr0408) auf die Virulenz von *S. pneumoniae* wurde im Infektionsversuch mit Mäusen untersucht. Die Inaktivierung des *glnQ*-Gens (spr0408) führte im Sepsis-Modell der Maus zu keiner signifikanten Verminderung der Virulenz der Mutante. Das Protein GlnQ (spr0408) besitzt im Vergleich zum parentalen *S. pneumoniae* Stamm D39 demnach keinen Einfluss auf die Pathogenität von *S. pneumoniae*. Eine Homologiesuche des GBS GlnQ mit den anderen in Pneumokokken annotierten ATP-bindenden Domänen der ABC-Glutamintransporter zeigte eine 82 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit GlnQ (spr1121). Das GlnQ (spr1121) von *S. pneumoniae* unterliegt keiner PavA-Regulation. Aufgrund der Homologie zu dem in der Virulenz von GBS involvierten GlnQ von GBS ist eine Analyse von GlnQ (spr1121) für die Zukunft sinnvoll.

4.5 Immunologische Untersuchungen

Zur Identifizierung neuer immunogener wurden die Proteine des Membran bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms mit konvaleszenten Patientenserum inkubiert. Es wurden zahlreiche Proteine durch die Antikörper erkannt. Dieses Ergebnis deutet an, dass Proteine dieses Subproteoms immunogenes Potenzial aufweisen. Die Identifizierung der reaktiven Proteine war problematisch, da aufgrund der unterschiedlichen Detektionsmethoden kaum eine Korrelation des immunbiologischen Proteinmusters mit den gefärbten Gesamtproteinmusters möglich war. Lediglich das schon als Virulenzfaktor bekannte Protein PspA konnte aufgrund des auffälligen Spotmusters zugeordnet werden. Der immunbiologische Ansatz bietet eine vielversprechende Methode zur Identifizierung neuer Virulenzfaktoren, vorausgesetzt der Entwicklung geeigneter Strategien bei der Zuordnung bzw. Identifizierung der detektierten immunogenen Proteine.

4.6 Ausblick

Die Etablierung der Methoden für die zweidimensionale Gelelektrophorese und die Erstellung der Mastergele der einzelnen Subproteome von *S. pneumoniae* stellt eine Datengrundlage für weitere vergleichende Proteomanalysen unter variierenden Bedingungen, die zur Aufklärung von in die Pathogenese involvierten Faktoren genutzt werden sollen, dar. Die Erweiterung der Proteindaten der Mastergele ist dabei ein begleitendes Projekt.

Die Anreicherung von Oberflächenproteinen mit LPXTG-Motiv im Sekretom soll durch die Erstellung einer Sortase-defizienten *S. pneumoniae* Mutante verwirklicht werden.

Eine Anreicherung sekretorischer Proteine im Zytoplasma durch Inaktivierung des sec-Sekretionsweges soll Informationen über die Sekretionswege der oberflächenlokalisierten Zytoplasma-Proteine geben.

5. Material und Methoden

5.1 Material und Chemikalien

5.1.1 Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien waren soweit nicht anders im Text aufgeführt von Sigma oder AppliChem.

5.1.2 Puffer und Lösungen, soweit nicht in den Methoden beschrieben

DNA-Probenpuffer (10 x Puffer):

50% Glycerol in TAE-Puffer, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.8, 0,1 %
Bromphenolblau

High-SDS-Puffer:

7 % SDS, 50 % deionisiertes Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO₃, pH 7.0, 0,1 %
N-Laurylsarcosin, 2,0 % Blockreagenz (Roche)

10 x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7.0

PBS:

1,8 mM KH₂PO₄, 80 mM Na₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4

PBST:

PBS mit 0,05 % Tween 20

Protein-Probenpuffer:

0,5 M Tris-Base, 10 % Glycerol, 2,5 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 5 %
2-Mercaptoethanol, pH 6.8

Proteintransferpuffer:

25 mM Tris-Base, 1,92 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,037 % SDS

5 x RNA-Probenpuffer:

0,15 % Bromphenolblau, 4 mM EDTA, 0,1 mg Ethidiumbromid, 1 M Formaldehyd, 20 % Glycerin, 30 % Formamid, 2,5 x MOPS Puffer

2 x SSC :

0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7.0

TAE:

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0

TE:

10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8.0

5.1.3 Antikörper und Antiseren

Enzym konjugierte Antikörper

Peroxidase konjugierte Ziege Anti-Kaninchenimmunglobuline (DakoCytomation)

Peroxidase konjugierte Ziege Anti-Human IgG (γ -Ketten spezifisch) (Sigma)

Antiseren und verwendete Seren

Polyklonales Kaninchenserum gegen ein 42 kDa Fragment des *pavA*-Proteins wurde nach Immunisierung mit dem aufgereinigtem, rekombinanten Fragment des *pavA*-Protein nach Standardprotokoll von Eurogentech (Belgien) hergestellt.

Polyklonales Kaninchenserum gegen Pneumokokken wurde nach Immunisierung mit hitzeinaktivierten Bakterien der Stämme R6x und ATCC 11733 (Serotyp 2) von Eurogentech (Belgien) hergestellt.

Humane convaleszente Patientenseren wurde von Dr. Gregor Zysk aus Düsseldorf bereitgestellt

5.1.4 Kulturmedien

Die meisten Medien und Medienzusätze wurden vor Gebrauch im Autoklaven 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Einige Medienzusätze und das chemisch definierte Medium (CDM) wurden aufgrund der Hitzeempfindlichkeit einiger Komponenten sterilfiltriert.

5.1.4.1 Nährmedien und Kulturbedingungen für *S. pneumoniae*-Stämme

Die Pneumokokken-Stämme wurden zunächst von der Glycerin-Stammkultur auf Blutagarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für die Anzucht in Flüssigkultur wurde Todd-Hewitt-Nährmedium mit 5 % Hefeextrakt (THY) oder chemisch definiertes Medium (CDM) verwendet. Die Kultur erfolgte bei 37°C.

Blutagarplatten (Merck)

23,0 g Pepton, 5,0 g NaCl, 14,0 g Agar agar, 65 ml Hammelblut, pH 7,4

THY-Medium

Todd-Hewitt-Broth (36,4 g/l), 0,5 % Hefeextrakt (Oxoid)

CpH8-Medium (Adams und Roe 1945; Lacks und Hotchkiss 1960)

Das CpH8-Medium ist ein semi-synthetisches Komplettmedium, das vorwiegend bei der Kultur der Pneumokokken zur Transformation verwendet wurde.

Tabelle 5.1 : Zusammensetzung vom CpH8-Medium

Pre C	800 ml
Supplement	26 ml
Glutamin (0,1%)	20 ml
Adams III	20 ml
Natriumpyruvat (2%)	10 ml
Phosphatpuffer, pH 8	30 ml
Hefeextrakt (5%)	18 ml

Tabelle 5.2 : Zusammensetzung der Einzelkomponenten vom CpH8-Medium

<i>Pre C</i>		<i>Adams III</i>	
Natrium-Acetat	1,208 g	Adams I	160 ml
Caseinhydrolysat	5 g	Adams II	40 ml
L-Tryptophan	5 mg	L-Asparagin	2 g
L-Cystein	5 mg	Cholin-HCl	300 – 400 mg
dest. Wasser	ad 1l	CaCl ₂	17 mg
pH 7,5 mit NaOH			
<i>Supplement</i>		<i>Phosphatpuffer</i>	
'3 in 1' Salze	60 ml	K ₂ HPO ₄ (1 M)	947 ml
Glucose (20%)	120 ml	KH ₂ PO ₄ (1 M)	53 ml
Saccharose (50%)	6 ml	Das Medium sollte am Ende pH 8 haben.	
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml		
Uridin (2 mg/ml)	120 ml		

Tabelle 5.3 : Zusätze der Einzelkomponenten vom CpH8-Medium

<i>Adams I</i>		<i>Adams II</i>	
Biotin	0,15 mg	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
Nikotinsäure	150 mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	500 mg
Pyridoxin-HCL	175 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
Ca-Pantothenat	600 mg	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	200 mg
Thiamin-HCl	160 mg	HCl konz.	10 ml
Riboflavin	70 mg	dest. Wasser	ad 1l
dest. Wasser	ad 1l		
<i>'3 in 1' Salze</i>			
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g		
CaCl ₂	500 mg		
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	3,3 mg		
dest. Wasser	ad 1l		

Chemisch definierte Medium (CDM)(von der Rijn, 1980)

Das chemisch definierte Medium wurde zur Kultivierung der Pneumokokken verwendet, um zu vermeiden, dass Proteinbestandteile der Vollmedien oder des CpH8-Mediums die Sekretom-Analysen beeinflussen.

Tabelle 5.4 : Zusammensetzung vom CDM

Spurenelement-Lösung	100 ml
Kaliumphosphatpuffer	100 ml
Aminosäure-Stocklösungen	je einfache Endkonzentration
Vitamin-Lösung	50 ml
Glukose-Lösung	100 ml
Lösung 5	100 ml
Kalziumchlorid-Lösung	10 ml
Natriumacetat-Lösung	20 ml
L-Cystein-Lösung	10 ml
Natriumhydrogencarbonat-Lösung	40 ml
Natriumphosphatpuffer	100 ml
Cholin-Lösung	10 ml
Einstellung des pH-Wertes auf 7,5, mit dest Wasser auf 1 L auffüllen, Sterilfiltration	

Tab.elle 5.5 : Lösungen für CDM

Gruppe	Komponenten	Konzentration
Spurenelemente-Lösung (10x)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	50 mg/l
	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7 g/L
	MnSO_4	50 mg/l
Kaliumphosphatpuffer (10x)	K_2HPO_4	2 g/L
	KH_2PO_4	10 g/L

Gruppe	Komponenten	Konzentration
Vitamin-Lösung (20x)	<i>p</i> -Aminobenzoid Säure	4 mg/L
	Biotin	4 mg/L
	Folsäure	16 mg/L
	Niacinamid	20 mg/L
	β-Nicotinamid Adenin Dinucleotide	50 mg/L
	Pantothenat Kalzium Salz	40 mg/L
	Pyridoxal	20 mg/L
	Pyridoxamindihydrochlorid	20 mg/L
	Riboflavin	40 mg/L
	Thiaminhydrochlorid	20 mg/L
	Vitamin B ₁₂	1 mg/L
Glukose-Lösung (10x)	Glukose	100 g/L
Lösung 5 (10x)	Adenine	200 mg/L
	Guaninhydrochlorid	200 mg/L
	Uracil	200 mg/L
Kalziumchlorid-Lösung (100x)	CaCl ₂ * 6 H ₂ O	1 g/L
Natriumacetat-Lösung (50x)	NaC ₂ H ₃ O ₂ * 3 H ₂ O	225 g/L
L-Cystein-Lösung (100x)	L-Cystein	50 g/L
Natriumhydrogencarbonat-Lösung (25x)	NaHCO ₃	62,5 g/L
Natriumphosphatpuffer (10x)	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	31,95 g/L
	Na ₂ HPO ₄	73,5 g/L
Cholin-Lösung (100x)	Cholin	2 g/L

Tab.elle 5.6 : Aminosäure-Stocklösungen für CDM

Komponenten	Konzentration
DL-Alanin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Arginin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Asparagin (125x)	12,5 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Aspartatsäure (50x)	5 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Cystin (500x)	25 g/L, in 1N HCl gelöst
L-Glutaminsäure (100x)	10 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Glutamin (125x)	25 g/L, in dH ₂ O gelöst
Glycin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Histidin (400x)	40 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Isoleucin (300x)	30 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Leucin (200x)	20 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Lysin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Methionin (400x)	40 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Phenylalanin (250x)	25 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Prolin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
Hydroxy-L-Prolin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Serin (1000x)	100 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Threonin (450x)	90 g/L, in dH ₂ O gelöst
L-Tryptophan (500x)	50 g/L, in 0,5 N HCl gelöst
L-Tyrosin (500x)	50 g/L, in 1 N HCl gelöst
L-Valin (500 x)	50 g/L, in dH ₂ O gelöst

Der Kaliumphosphatpuffer, Lösung 5, Kalziumchlorid-Lösung, Natriumacetat-Lösung und Natriumphosphatpuffer wurden autoklaviert. Alle anderen Lösungen und die Aminosäure-Stocklösungen wurden sterilfiltriert. Nach Zugabe aller Komponenten wurde das Medium mit 10 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und anschließend sterilfiltriert. In vollständiger Zusammensetzung war das CDM maximal 3 Tage haltbar.

5.1.4.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für *Escherischia coli* Stämme

Die *E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Als Festmedium wurden LB-Bactoagarplatten verwendet. Für die Transformation von *E. coli* SOC-Medium verwendet.

LB-Medium (Luria- Bertani)

1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7.5

Bacto-Agarplatten

LB-Medium + Bacto-Agar (2 %)

SOB-Medium

2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl

SOC-Medium

SOB-Medium mit 20 mM Glucose

5.1.4.3 Stammhaltung von Bakterien

Die Aufbewahrung der Bakterien erfolgte bei *E. coli* auf mit Parafilm abgedichteten Agarplatten bei 4°C für mehrere Wochen und bei Pneumokokken bei Raumtemperatur für einige Tage möglich. Für die Aufbewahrung über längere Zeiträume wurden Glycerin-Kulturen mit 20 % Glycerin für die *S. pneumoniae* Stämme und mit 25 % Glycerin für die *E. coli* Stämme angelegt und bei –80°C gelagert.

5.1.5 Bakterienstämme

Streptococcus pneumoniae D39 (Serotyp 2) und die isogenen Insertionsmutanten D39 Δ pavA (PN28) und D39 Δ pavA (PN41) wurden verwendet. Diese Mutanten sind im Sepsismodell der Maus attenuiert. Die Mutante PN28 besitzt eine Insertion im 3'-Ende des pavA-Gens. Die Mutante PN41 besitzt eine Insertion im 5'-Bereich des pavA-Gens. Als Vergleichsstämme wurden bei den molekularbiologischen Versuchen außerdem *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 35A (P37) und Serotyp 4(TIGR4) verwendet. Die Insertionsmutante PN41 wurden

ebenfalls nur als Vergleichsstamm bei den molekularbiologischen Versuchen eingesetzt. Die Anzucht erfolgte in THY-Medium oder CDM.

Als Transformaten für die konstruierten Plasmide wurde *Escherichia coli* TOP10 von Invitrogen, M15 (pREP4) von QIAGEN und DH5 α eingesetzt. Die *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium kultiviert.

5.2 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen

5.2.1 Zellaufschluss

Die Bakterien wurden vom Kulturmedium mittels Zentrifugation bei 6000 x g für 12 min bei 4°C getrennt, anschließend zwei mal mit PBS gewaschen und das resultierende Sediment in 1-2 ml 40 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Damit die Proteine nach der Freisetzung aus dem Zytoplasma nicht durch Proteasen zersetzt wurden, wurden die 40 ml Tris-HCl-Puffer mit dem Proteaseinhibitormix Complete[®] von Roche versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte mechanisch mit der French Press. Die French Press wurde 1950 von Millner, Lowrence und French als diskontinuierlich zu betreibendes Zellaufschlussgerät vorgestellt. Ziel des Zellaufschlusses war die partielle Zerstörung der Zellwandstruktur, um ein Austreten des Zytoplasmas in die umgebende Flüssigkeit zu ermöglichen und die intrazellulären Wertstoffe, in diesem Fall die Proteine, freizusetzen. Zum Betrieb wurde die Zellsuspension in den vorgekühlten Zylinderraum eingefüllt. Bei verschlossener Auslassbohrung wurde der Kolben mittels einer Hochdruckhydraulikpresse auf einen Druck von 20 000 psi (entspricht 1379 bar) eingestellt. Sobald dieser erreicht war, wurde das Ventil soweit geöffnet, dass die Suspension mit geringem Volumenstrom austrat. Der Einsatz der French Press für den Aufschluss unterschiedlicher Mikroorganismen wurde von Hughes, Wimpenny und Lloyd untersucht. Sie stellten fest, dass bei den meisten Organismen bereits für den ersten Durchgang ein Aufschlussgrad von 50% erreicht wurde. Zur Erhöhung des Aufschlussgrades wurden vier Durchgänge mit der French Press durchgeführt.

5.2.2 Herstellung von Bakterienlysaten

Für die Herstellung von Bakterienlysaten wurden 3 ml LB-Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert oder 3 ml Bakteriensuspension aus der zu kontrollierenden Großkultur entnommen. Die Bakterien wurden dann für bei 3000 x g für 5 min sedimentiert, der

Überstand verworfen und das Sediment durch einmaliges Waschen mit PBS von Medienresten befreit. Das resultierende Bakteriensediment wurde in 150 µl PBS und 150 µl Protein-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 99°C erhitzt. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene SDS unterstützte die Lyse der Bakterienzellen und die Kombination von SDS, β-Mercaptoethanol und Erhitzen denaturierte die bakteriellen Proteine. Von den Proteinproben wurden je nach Proteingehalt 5-10 µl in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

5.2.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der für die zweidimensionale Gelelektrophorese angefertigten Proteinlösungen erfolgte nicht über die Methode von Bradford oder Lowry. Die in der 2D-Gelelektrophorese verwendeten Puffer enthielten hohe Konzentrationen von chaotropen Substanzen und starken Detergenzien, die mit diesen beiden Methoden nicht kompatibel waren. Daher wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration das 2D Quant Kit von Amersham verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970)

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld genutzt wird. Das Wanderungsverhalten hängt von der Porengröße des Gels, der angelegten Spannung, sowie der Größe und Ladung des sich bewegenden Makromoleküls ab. Zur Auftrennung von Proteingemischen nach deren Molekulargewichten, wurde die Nettoladung der Moleküle durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt. Alle Proteine wanderten nach SDS-Anlagerung zur Anode und wurden in der Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. .

Für die Elektrophoresen mit SDS-Polyacrylamidgelen wurden Gele mit 12% Acrylamid im Trenngel und 4% Acrylamid im darrüberliegenden Sammelgel verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 5.5 aufgeführt. Die Elektrophoresen wurden bei einer Spannung von 200 V durchgeführt.

Tabelle 5.5: Bestandteile der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel 12 % Polyacrylamid		Sammelgel 4 % Polyacrylamid	
dest. H ₂ O	2,5 ml	dest. H ₂ O	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,9 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
10% SDS	75 µl	10% SDS	40 µl
30% Acrylamid/ 0,8 Bis	3 ml	30% Acrylamid/ 0,8 Bis	0,5 ml
10% APS	40 µl	10% APS	20 µl
TEMED	4 µl	TEMED	4µl

5.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese (Klose, 1975; O'Farrell, 1975)

Zur Auftrennung komplexer Proteingemische von *S. pneumoniae* wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet, die auf zwei verschiedenen Trennungsprinzipien beruht. Beim ersten Auflösungsverfahren wurde die sogenannte isoelektrische Fokussierung (IEF), eine Trennung nach Ladung, angewandt. In der zweiten Dimension, die 90° versetzt zur ersten erfolgte, wurden die Proteine nach dem Molekulargewicht der Proteine aufgetrennt.

5.2.5.1 1.Dimension - Isoelektrische Fokussierung

Jedes Protein besitzt eine Nettoladung, die es dem Molekül ermöglicht, in einem elektrischen Feld zum jeweils entgegengesetzten Pol zu wandern. Diese Nettoladung ändert sich mit dem pH-Wert des umgebenen Milieus und beträgt bei vollständiger Protonierung des Proteins null. Den pH-Wert an dem die Nettoladung eines Proteins Null beträgt, wird als isoelektrischen Punkt (IP) bezeichnet, da an diesem pH keine Wanderung des Moleküls im elektrischen Feld mehr möglich ist. Das Protein ist auf diesen pH-Wert fokussiert worden. Jedes Proteinmolekül besitzt einen individuellen isoelektrischen Punkt. Zur Durchführung der IEF wurde das System der IPGphor von Amersham verwendet, welches ein aktives Einquellen der Probe in die IPG-Streifen (ReadyStrip IPG Strips von Bio-Rad) ermöglichte. Bei der Rehydrierung wurde die Probe durch eine geringe Spannung aktiv in das Gel gezogen. Die IPG-Streifen enthalten einen auf Folie fixierten im Gel enthaltenen immobilisierten pH-Gradienten, der verschiedene pH-Spannweiten haben kann (Wildgruber et al., 2000; Poland et al., 2003; Görg et al., 1999). Als Standard wurde ein pH-Gradient von pH 4 bis 7 verwendet, aber auch andere Gradienten wurden getestet. Die IPG-Streifen liegen in

dehydrierter Form vor und wurden vor der Fokussierung rehydriert. Die Rehydrierung erforderte mindestens 12 Stunden. Die Rehydrierung und auch die Fokussierung erfolgten mit Rehydrierungslösung, die bereits die Probe enthielt. Es wurden verschiedenen Rehydrierungslösungen getestet, die Zugabe von 0,5 % IPG-Puffers des entsprechenden pH-Gradientens erfolgte kurz vor der Fokussierung.

Tabelle 5.7 : Rehydrierungspuffer für die isoelektrische Fokussierung

Rehydrierungspuffer R1	
9 M Harnstoff	13,5 g
1 % DTT (60mM)	0,25 g
Proteaseinhibitormix Complete (Roche)	1 Tablette
Milli Q Wasser	ad 25 ml
Rehydrierungspuffer R2	
9 M Harnstoff	13,5 g
1 % DTT (60mM)	0,25 g
2 % CHAPS (32,5mM)	0,5 g
Proteaseinhibitormix Complete (Roche)	1 Tablette
Milli Q Wasser	ad 25 ml
Rehydrierungspuffer R3	
9 M Harnstoff	13,5 g
1 % DTT (60mM)	0,25 g
4 % CHAPS (65mM)	1 g
Proteaseinhibitormix Complete (Roche)	1 Tablette
40 mM Tris-HCl pH 7,0	ad 25 ml
Rehydrierungspuffer R4	
7 M Harnstoff	10,5 g
2 M Thioharnstoff	3,8 g
1 % DTT (60mM)	0,25 g
4 % CHAPS (65mM)	1 g
Proteaseinhibitormix Complete (Roche)	1 Tablette
Milli Q Wasser	ad 25 ml

Die Fokussierungsstärke, sowie die Proteinbeladung der IPG-Strips und das Volumen der eingesetzten Rehydrierungslösung richteten sich nach der Länge der IPG-Strips. Es wurden 7 cm, 11 cm und 18 cm lange Streifen verwendet.

Tabelle 5.7 : Richtwerte für IPG-Strips verschiedener Länge

	7 cm	11 cm	18 cm
Volumen der Rehydrierungslösung	125 µl	225 µl	350 µl
Proteinbeladung	5µg – 50 µg	20 µg – 120µg	75µg – 450µg
Fokussierungsstärke	15 000 Vhrs – 45 000 Vhrs	20 000 Vhrs – 80 000 Vhrs	35 000 Vhrs- 150 000 Vhrs

Zur Durchführung der IEF wurden Keramikscheffchen der Firma Amersham verwendet, die die sogenannte In-Gel Rehydrierung ermöglichen (Rabilloud *et al.*, 1994). Dazu wurde die benötigte Menge Rehydrierungspuffer, der schon das Proteingemisch enthielt, gleichmäßig auf den Boden des Scheffchens verteilt und anschließend wurde der IPG-Streifen mit der dehydrierten Gelseite dem Puffer zugewandt luftblasenfrei aufgelegt. Um das Auskristallisieren des im Rehydrierungspuffer enthaltenen Harnstoffes zu vermeiden, wurde der Streifen mit 1-2 ml Mineralöl bedeckt und die Fokussierung gestartet. Es wurden folgende Fokussierungsprotokolle mit einer Limitierung von 50 µA pro Gelstreifen verwendet :

Tabelle 5.8 : Fokussierungsprotokolle für die isoelektrische Fokussierung von IPG-Streifen verschiedener Längen

Fokussierungsprotokoll für 7 cm IPG-Streifen		
Rehydrierung	3 Stunden	
aktive Rehydrierung bei 30 V	10 Stunden	
500 V	0,5 Stunden	Gradient
500 V	0,5 Stunden	
2000 V	0,5 Stunden	Gradient
2000 V	0,5 Stunden	
5000 V	0,5 Stunden	Gradient
5000 V	0,5 Stunden	
8000 V	1 Stunde	Gradient
8000 V	5 Stunden	

Fokussierungsprotokoll für 11 cm IPG-Streifen		
Rehydrierung	3 Stunden	
aktive Rehydrierung bei 30 V	10 Stunden	
500 V	0,5 Stunden	Gradient
500 V	0,5 Stunden	
2000 V	0,5 Stunden	Gradient
2000 V	0,5 Stunden	
5000 V	0,5 Stunden	Gradient
5000 V	0,5 Stunden	
8000 V	1 Stunde	Gradient
8000 V	7,5 Stunden	

Fokussierungsprotokoll für 18 cm IPG-Streifen		
Rehydrierung	2 Stunden	
aktive Rehydrierung bei 30 V	10 Stunden	
500 V	0,5 Stunden	Gradient
500 V	0,5 Stunden	
2000 V	0,5 Stunden	Gradient
2000 V	0,5 Stunden	
5000 V	0,5 Stunden	Gradient
5000 V	1 Stunde	
8000 V	1 Stunde	Gradient
8000 V	13 Stunden	

5.2.5.2 Äquilibration

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen vorsichtig aus den Schiffchen entfernt und das Mineralöl vorsichtig abgetupft. Die Streifen wurden anschließend mit der Gelseite nach oben in ein Plastikgefäß gegeben, 25 ml Äquilibrationpuffer (6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS in 0,05 M Tris/HCl, pH 8,8) mit 1 % DTT zugegeben und 12 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. DTT trennt die Disulfidbrücken der Proteine. Anschließend wurde dieser Schritt mit frischem Äquilibrationpuffer nach Zusatz von 250 mM Iodacetamid wiederholt. Iodacetamid carboxymethyliert die freigewordenen Cysteinreste der Disulfidbrücken. Die Äquilibration erfolgte, um die Proteine mit SDS zur anschließenden Gelelektrophorese zu umhüllen. Zur Vermeidung elektroendosmotische Effekte und zur Verbesserung des Proteinübergangs von der ersten in die zweite Dimension enthielt dem Äquilibrationpuffer 30 % Glycerin [Görg, 2000].

5.2.5.3 2. Dimension – SDS-PAGE

Die 2. Dimension ist eine SDS-PAGE nach *Laemmli et al.* (1970) ohne Sammelgel. Der IPG-Streifen der 1.Dimension wurde luftblasenfrei auf die Oberfläche des Polyacrylamidgels

aufgelegt und anschließend mit Bromphenolblau gefärbter 1 % IEF Agarose von Amersham auf dem Gel fixiert. Vor der Fixierung des Streifens wurde noch ein auf Filterpapier immobilisierter Molekulargewichtsmarker (Protein Ladder 10-200 kDa von MBI Fermentas) mit auf die Geloberfläche aufgebracht. Das Bromphenolblau visualisierte während der Elektrophorese die Lauffront. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 19 Stunden und wurde mit dem Hoefer Dalt System von Amersham durchgeführt. Die 20cm x 20cm großen 12% PAA-Gele wurden mit Hilfe des Hoefer Dalt Multiple Gel Caster von Amersham hergestellt. In dieser Kammer konnten gleichzeitig 22 Gele mit einer Dicke von 1,5 cm hergestellt werden.

5.2.6 Proteinfällungen

Nach dem Aufschluss liegen die Proteine zusammen mit sämtlichen anderen Zellbestandteilen wie Zuckern, Salzen, Nukleinsäuren, Membranen, Zellwandtrümmern und den restlichen Bestandteilen der Polysaccharidkapsel in der Probe vor. Um die Proteine zu isolieren wurden die feste Bestandteile durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 50 min bei 4°C aus dem Lysat entfernt und anschließend die Proteine durch eine selektive Fällung aufgereinigt. Es wurden verschiedene Fällungsmethoden angewandt und auf ihre Eignung hin geprüft.

5.2.6.1 Fällung von Proteinen mit organischen Lösungsmitteln

Fällungen mit organischen Lösungsmitteln sind bei vielen Proteinen mit einem mehr oder weniger starken Verlust der Aktivität verbunden. Organische Lösungsmittel induzieren eine partielle Entfaltung der Proteine, indem sie mit ihren unpolaren Gruppen stabilisierende intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen im Protein beeinträchtigen. Die Fällungen sollte aufgrund der auftretenden Lösungswärme auf Eis erfolgen.

Fällung der Proteine mit Aceton

Eiskaltes Aceton (-20°C) wurde tropfenweise bis zu einem Endverhältnis von 1:2 unter Rühren zugegeben. Nach Zugabe des Fällungsmittels betrug die für die Einstellung des Gleichgewichtes erforderliche Inkubationszeit nicht mehr als 15 min. Anschließend konnten die gefällten Proteine mit 5000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert werden, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Lösemittelreste wurden durch Trocknung im Vakuum

oder an der Luft entfernt. Das Proteinpräzipitat wurde in einem für die 2D-Gelelektrophorese kompatiblen Puffer resolubilisiert und bei -80°C gelagert.

Fällung der Proteine mit Phenol

1 ml des proteinreichen Überstandes wurde mit 1 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,2 gemischt und anschließend werden 2 ml Phenol dazu gegeben. Der Fällungsansatz wurde 1-2 min vermischt, kurz ruhengelassen, 10 min bei 70°C im Wasserbad erhitzt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4°C . Die obere wässrige Phase wurde anschließend mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die gefällten Proteine reichert sich zwischen den beiden Phasen an und wurden nicht abgenommen. Zu der verbleibenden unteren Phenolphase und der proteinangereicherten Interphase wurden 2 ml Milli Q Wasser zugegeben und die Prozedur mit Wasserbad (70°C , 10 min) und Eis (0°C , 10 min) wiederholt. Die Phasen wurden wieder durch Zentrifugation bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4°C getrennt und die obere Phase wurde abgesaugt und verworfen. Zur Phenolphase wurde anschließend 4 ml eiskaltes Aceton zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gekühlt und gelegentlich geschwenkt. Die Proteine werden bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment mit 6 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Erneute Zentrifugation bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4°C trennte die Proteine von der Waschlösung. Das Sediment wurde durch Trocknung im Vakuum oder an der Luft von Lösungsmittelresten befreit. Das Proteinpräzipitat wurde anschließend in einem für die 2D-Gelelektrophorese kompatiblen Puffer resolubilisiert und bei -80°C gelagert.

5.2.6.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Die Ammoniumsulfatfällung ist eine Fällung über die Ionenstärke. Die Fällung von Proteine bei hoher Ionenstärke ist auf die Abschirmung von Oberflächenladungen sowie die Konkurrenz um das Lösungsmittel (Erniedrigung der Wasseraktivität) zurückzuführen. Die Aktivität der Proteine wird dabei nicht beeinträchtigt.

Der pH-Wert des proteinreichen Überstandes wurde nach dem Zellaufschluss mit Ammoniak neutralisiert. Anschließend wurde im Eisbad unter Rühren langsam fein geriebenes Ammoniumsulfat zugegeben bis eine Sättigung von 80 – 85% erreicht ist (alternativ kann auch gesättigte Ammoniumsulfatlösung verwendet werden). Nach 30 min wurde das

Proteinpräzipitat bei 10 000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Der Niederschlag enthielt noch große Mengen an Ammoniumsalz und wurde daher noch dreimal gründlich mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das Sediment wurde durch Trocknung im Vakuum oder an der Luft von Acetonresten befreit und anschließend wurden die präzipitierten Proteine in einem für die 2D-Gelelektrophorese kompatiblen Puffer resolubilisiert und bei –80°C gelagert.

5.2.6.3 Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Eine weitere Fällungsmethode erfolgt mit Trichloressigsäure. Eiskalte 100%ige Trichloressigsäure, in Aceton gelöst, wurde zu der Proteinlösung bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Die Fällung erfolgte bei 4°C über Nacht. Die gefällten Proteine wurden dann bei 5000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und der Überstand dekantiert und verworfen. Das Sediment wurde anschließend zwei mal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die gefällten Proteine wurden anschließend bei 5000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment getrocknet. Die Trocknung der Proteine erfolgte im Vakuum oder alternativ an der Luft. Das Proteinpräzipitat wurde anschließend in einem für die 2D-Gelelektrophorese kompatiblen Puffer resolubilisiert und bei –80°C gelagert.

5.2.7 Probenaufarbeitung für die Zweidimensionale Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche speziell auf die 2D-Gelelektrophorese abgestimmte Extraktionsmethoden zur Gewinnung von Proteinen etabliert. Die Proteinextraktion bei der TCA-Methode erfolgte durch eine Fällung sämtlicher Proteine mit trichloressigsäurem Aceton. Nach diesem Schritt erfolgte eine Resolubilisierung der ausgefällten Proteine durch einen Puffer-Cocktail, der gleichzeitig als 2D-Gelelektrophorese-Laufpuffer diente. Die sequentielle Proteinextraktion beruht nicht auf der Fällung von Proteinen, sondern auf der Herstellung unterschiedlicher Extrakte durch Einsatz verschiedener Extraktionspuffer. Alle verwendeten Puffer enthielten den Proteaseinhibitormix Complete[®] von Roche (Olivieri *et al.*, 2001).

5.2.7.1 TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion

Eine Pneumokokkenkultur von 1 L Volumen wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 kultiviert, die Bakterien mit einer Zentrifuge bei 6000 x g für 12 min bei 4°C sedimentiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend das Sediment in 1-2 ml 40 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Der Zellaufschluss der Bakterien erfolgte mit der French Press. Die festen Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationschritt bei 20 000 x g für 50 min bei 4°C sedimentiert. Der klare Überstand, der die löslichen zytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde abgenommen und die Proteine mittels einer TCA/Aceton-Fällung präzipitiert. Die gefällten zytoplasmatischen Proteine wurden in Rehydrierungspuffer R 1 (9 M Harnstoff, 1 % DTT, Proteaseinhibitormix Complete, 0,5 % IPG-Puffer) resolubilisiert. Das Zelltrümmersediment wurde einmal mit 40 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen und anschließend in 1 ml Inkubationspuffer (15 mM KCl, 10 mM EDTA, 20% Glycerin, 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2) aufgenommen. Zur Degradation der Zellwand-Peptidoglycane wurden 50 µl Mutanolysin (5000 U/ml) zugegeben. Die eigentliche Extraktion erfolgte durch das Detergenz CHAPS. CHAPS ist ein nicht-denaturierendes Zwitterion, das oft in der Protein-Solubilisierung eingesetzt wird. Im ersten Extraktionsschritt wurden 5 mM CHAPS eingesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Die schon zum Teil zersetzten Zelltrümmer wurden bei 20 000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand, der schon ein Teil der extrahierten Proteine enthielt, wurde sorgfältig abgenommen und auf Eis gelagert. Das verbleibende Zelltrümmersediment wurde wieder in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert, mit 50 µl Mutanolysin (5000 U/ml) und 20 mM CHAPS versetzt und ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Die verbleibenden unlöslichen Bestandteile wurden bei 20 000 x g für 30 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, mit dem ersten Überstand vereint und das Sediment verworfen. Die extrahierten Proteine wurden anschließend durch eine TCA/Aceton-Fällung präzipitiert. Das Proteinpräzipitat wurde in Rehydrierungspuffer R2 (9 M Harnstoff, 1 % DTT, 2 % CHAPS, Proteaseinhibitormix Complete, 0,5 % IPG-Puffer) resolubilisiert. Die Lagerung der resolubilisierten Proteine erfolgte bei -80°C.

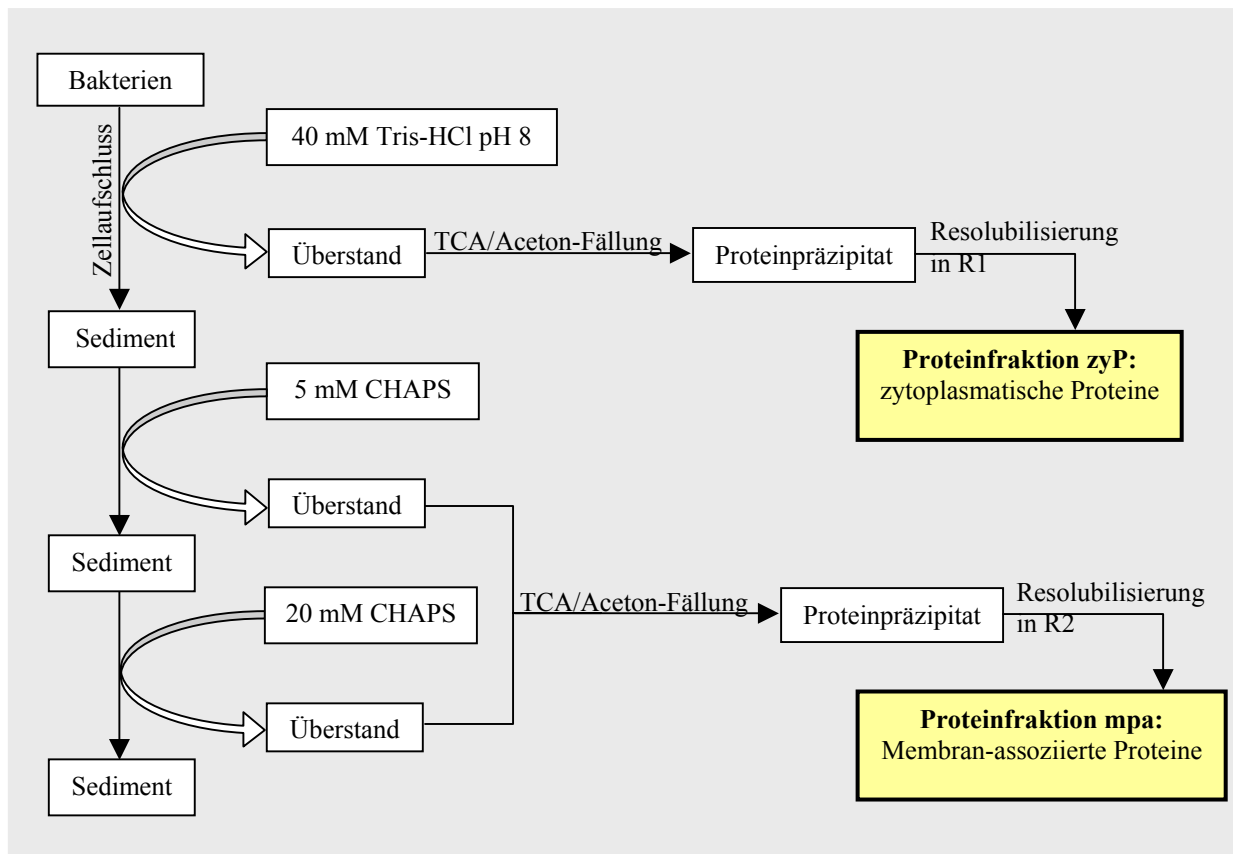


Abbildung 5.1 : Flussdiagramm der TCA/Aceton-präzipitationsbasierte Proteinextraktion

5.2.7.2 Fraktionierte Proteinextraktion

Eine Pneumokokkenkultur von 1 L Volumen wurde bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,4 kultiviert, die Bakterien mit einer Zentrifuge bei $6000 \times g$ für 12 min bei $4^{\circ}C$ sedimentiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend das Sediment in 1-2 ml 40 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Durch den Zellaufschluss mit der French Press wurden die zytoplasmatischen Proteine in den Puffer freigesetzt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei $20\,000 \times g$ für 50 min bei $4^{\circ}C$ sedimentiert. Der klare Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde abgenommen und mit Nukleasen behandelt. Intakte Nukleinsäuren haben einen negativen Effekt auf die isoelektrische Fokussierung, da sie die Poren des Gels verstopfen. Die Probe wurde daher mit $10 \mu g/ml$ DNase I und $10 \mu g/ml$ RNase A für 1,5 Stunden bei $37^{\circ}C$ verdaut. Anschließend wurde die Probe bei $20\,000 \times g$ für 10 min bei $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die zytoplasmatischen Proteine und wurde dann in der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert und mit der Bezeichnung ZP gekennzeichnet.

Die sedimentierten Zelltrümmer wurden zwei mal mit 40 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen, um eine Verunreinigung der nächsten Fraktion mit zytoplasmatischen Proteinen zu vermeiden.

Das Zelltrümmersediment wurde dann in 600 µl Rehydrierungspuffer R3 (9 M Harnstoff, 1 % DTT, 4 % CHAPS, Proteaseinhibitormix Complete, 40 mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Diese Proteinproben wurden direkt in die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt. Die restlichen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 30 min bei 10°C sedimentiert und der klare Überstand weiterverwendet. Diese Fraktion enthielt Membran- und Zellwand-assoziierte Proteine wurde mit dem Kürzel MP1 benannt.

Der letzte Extraktionsschritt erfolgte mit SDS-Proteinprobenpuffer und ist nicht mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese kompatibel. Nach dem das verbliebene Zelltrümmersediment zwei mal mit Rehydrierungspuffer gewaschen wurde, wurde das Sediment in 50 µl SDS-Proteinprobenpuffer ohne Bromphenolblau resuspendiert und für 15 min bei 99°C erhitzt. Die restlichen Feststoffe wurden durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 30 min bei 4°C entfernt. Diese Fraktion wurde mit der Bezeichnung MP2 benannt.

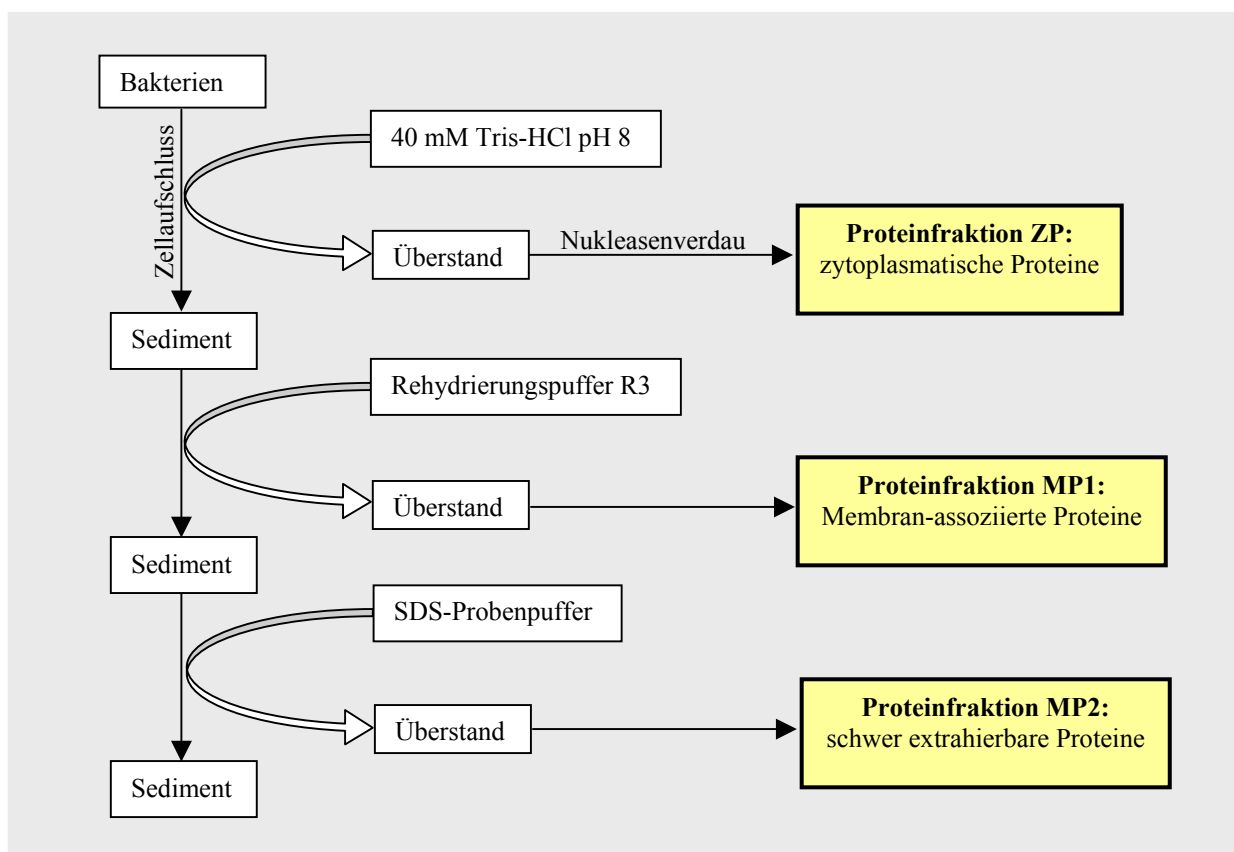


Abbildung 5.2: Flussdiagramm der fraktionierten Proteinextraktion

5.2.7.3 Isolierung sekretorischer Proteine

Zur Isolierung der sekretierten Proteine wurden die Pneumokokken in CDM kultiviert, da in den Vollmedien undefinierte Mengen an Proteinen und Peptiden vorhanden sind, die die Expressionsprofile verfälschen würden. Der Medienüberstand einer 1 L Pneumokokken-Kultur mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,4 wurde nach der Sedimentation der Bakterien vorsichtig abgenommen und anschließend mittels Bottle Top Filter (Millipore) sterilfiltriert, um zytoplasmatische Proteinverunreinigungen durch verschleppte Bakterien zu vermeiden. Die ins Medium sekretierten Proteine wurden mit trichloressigsauerm Aceton über Nacht gefällt. Das Proteinpräzipitat wurde bei 6000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurde zwei mal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Danach wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet und bei -20°C gelagert. Das Präzipitat der sekretierten Proteine wurde in Rehydrierungspuffer R4 (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % DTT, 4 % CHAPS, Proteaseinhibitormix Complete) aufgenommen.

5.2.8 Proteinfärbungen

5.2.8.1 Kolloidales Coomassie

Die in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie detektiert, welches eine Nachweisgrenze von ~ 5 ng besitzt. Dazu wurden die Gele für 1 Stunde fixiert, zweimal mit dest. Wasser gewaschen und anschließend in der Färbelösung geschwenkt. Die Färbung erfolgte über Nacht. Anschließend wurden Coomassie-Reste im Wasserbad entfernt. Die Färbelösung des kolloidalen Coomassie bestand aus 200 ml Methanol und 800 ml kolloidale Coomassie Stocklösung. Ein Liter Stocklösung enthielt 4 % Phosphorsäure (24 ml 85 % Phosphorsäure), 10 % Ammoniumsulfat (100g) und 20 ml Coomassie Brilliant Blau Stock (5 %ige Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung).

5.2.8.2 Silberfärbung (nach Shevchenko et al.,)

Die Silberfärbung ist sensitiver als die Coomassie-Färbung. Proteinmengen können im Nanogramm Bereich detektiert werden. Die zahlreichen Arbeitsschritte dieser Färbung erhöhen das Risiko, die empfindlichen Polyacrylamidgele zu beschädigen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig in die Fixierlösung (50 % Methanol, 5 % Essigsäure) gelegt und über Nacht geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde die Fixierlösung

abgesaugt und die Waschlösung (50 % Methanol) zugegeben. Nach einer Stunde Schwenkens wurde die Waschlösung abgesaugt und anschließend 2 x 30 min mit dest. Wasser gespült. Nach Beendigung des ersten Waschprotokolls wurde die Sensitivierungslösung (0,02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) zugegeben und für 2 geschüttelt. Anschließend wurde das zweite Waschprotokoll durchgeführt, welches aus 2 x 1 min und 1 x 10 min spülen mit dest. Wasser bestand. Zur Färbung wurde vorgekühlte Silbernitratlösung (0,1 % AgNO_3) verwendet. Die Färbung erfolgte für 30 min bei 4°C. Darauf folgte das dritte Waschprotokoll, wobei 3 x 1 min unter Schwenken mit dest. Wasser gespült wurde. Die Detektion der Spots erfolgte mit der Entwicklerlösung (2 % Na_2CO_3 , 0,04 % Formalin). Wenig Entwicklerlösung wurde aufgegeben, kurz geschwenkt und gleich wieder abgezogen, anschließend wurde mit Entwickler bis zur gewünschten Stärke entwickelt. Die Reaktion wurde mit Stopplösung (5 % Essigsäure) für 20 min beendet. Die Lagerung der Gele erfolgte in 1%iger Essigsäure oder alternativ in dest. Wasser.

5.2.8.3 Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffes RuBPS (Rabilloud, 2001)

Zur Herstellung des Fluoreszenzfarbstoffes Ruthenium-II-tris-bathophenanthrolin-disulfat, abgekürzt RuBPS, wurden 0,1 g Kaliumpentachlororuthenat (entspricht 0,28 mM) in einem Rundkolben mit Schliff vorgelegt und 10 ml Milli Q Wasser zugegeben. Ein Rückflusskühler wurde auf den Schliff gesetzt und die Lösung wurde für 20 min unter Rückfluss gekocht. Die Erhitzung erfolgte mit Hilfe eines Ölbad, welches eine Temperatur von ca. 120°C haben musste, um einen optimalen Rückfluss gewährleisten zu können. Die Lösung hatte zu diesem Zeitpunkt eine rotbraune Farbe. Anschließend wurden 0,46 g Bathophenanthrolin-disulfonatinatriumsalz (entspricht 0,84 mM) zugegeben, welches das Ruthenium mit drei Molekülen komplexierte. Das Gemisch wurde weitere 20 min unter Rückfluss gekocht und es entstand eine grünlichbraune Lösung. Danach wurden 2,5 ml einer frisch angesetzten 500 mM Natrium-Ascorbat-Lösung zugesetzt und weitere 20 min unter Rückfluss gekocht. Die Farbe der Lösung veränderte sich dabei zu orange-braun. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Der gewonnene Farbstoff 20 mM RuBPS. Zur Lagerung wurde der Farbstoff aliquotiert, in der Speed Vac getrocknet und bei – 80°C aufbewahrt. Zur Färbung wurden die Kristalle wieder in Milli Q Wasser gelöst.

5.2.8.4 Fluoreszenz-Färbung mit RuBPS

Das Protokoll ist für zwei 20 cm x 20 cm große Polyacrylamidgele bemessen. Die Proteingele wurden vorsichtig aus den Glasplatten entnommen, gekennzeichnet, in eine Wanne gelegt und mit dest. Wasser abgespült. Durch intensives Waschen und Fixieren wurden SDS-Reste von des Elektrophoresepuffers aus den Gelen zu entfernen. Es wurden 250 ml Fixierer (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) zugegeben, 1-2 Stunden geschwenkt und anschließend durch 500 ml frischen Fixier ersetzt und über Nacht geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde die Lösung gewechselt und 250 ml neue Fixierlösung zugegeben. Nach weiteren 1-2 Stunden wurde der Fixierer ein letztes Mal ausgetauscht. 500 ml Fixierlösung wurde das farbgebende RuBPS-Konzentrat zugesetzt. Pro Gel wurden 10 µl des 20 mM RuBPS-Stocks eingesetzt. Die Endpunktfärbung erfolgte über Nacht unter Schwenken. Die Färbung wurde unter UV-Licht detektiert. Um die Gele vor dem Austrocknen beim Fotografieren zu schützen, wurden sie vorher für mindestens 30 min gewässert. Der Farbstoff färbt nicht direkt die Proteine an, sondern das von den Proteinen gebundene SDS.

5.2.9 Western Blot und Immunoblot (Towbin *et al.*, 1979)

Beim Western Blot wurde eine durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte Protein-Probe unter Erhaltung des Auftrennungsmusters auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteine konnten anschließend mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert werden. Vor Verwendung der Membran wurde sie in Methanol aktiviert, in dest. Wasser gewaschen und dann zusammen mit dem Gel und den Filtern in Proteintransferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte nach folgenden Schema :



Abbildung 5.3 : Aufbau eines Western Blot in der Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot SD

Der Transfer erfolgte für 45 min mit 1 mA pro cm² Gel. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens eine Stunde in PBST mit 3% BSA geschwenkt. Nach der Absättigung wurde für eine Stunde mit dem 1. Antikörper inkubiert. Polyklonale Antikörper aus Kaninchenserum wurden dabei in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST mit 1% BSA eingesetzt und convaleszente Patientenserum wurden in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST mit 1% BSA eingesetzt. Nach der Inkubation wurde 2 x mit PBST gespült und 2 x 5 min mit PBST gewaschen, um unspezifische Hintergrundreaktion zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (1:1000 Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase in PBST bzw. 1:1000 Ziege-anti-Human IgG (γ -Ketten spezifisch)-Peroxidase). Zusätzlich wurde Peroxidase gekoppeltes *Strep*-Tactin in einer Verdünnung von 1:20 000 zugegeben, falls in der vorhergehenden SDS-PAGE der Protein Ladder 10-200 kDa von MBI Fermentas verwendet wurde, dessen Proteine eine integrierte *Streptac*-Sequenz enthielten. Anschließend wurde 2 x mit PBST gespült und 2 x 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte über Chemolumineszenz mit dem ECL Western Blotting Detection Reagents von Amersham und den entsprechenden Chemolumineszenz-sensitiven Hyperfilm ECL Filmen von Amersham. Die Entwicklung der Filme erfolgte in der Dunkelkammer mit Fixierungs- und Entwicklerlösung von AGFA.

5.2.10 Färbung von PVDF Membranen

Auf PVDF immobilisierte Proteine wurden mit der MemCode Reversible Protein Stain für PVDF Färbung von Pierce durchgeführt. Die Durchführung der Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Der Vorteil dieser Färbemethode gegenüber der herkömmlichen Coomassie oder Ponceau S Färbung lag in einer stark erhöhten Sensitivität.

5.2.11 Produktion von Proteinen

Zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte zunächst eine Kultur der *E. coli*-Stämme in 500 ml LB-Medium unter Antibiotika-Selektionsdruck schüttelnd bei 37°C. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von 1 Volumen LB-Medium mit 2 mM IPTG. Die Induktion erfolgte für 4-5 h schüttelnd bei 28°C. Das rekombinante Protein wurde dabei intrazellulär angereichert. Nach der Sedimentation der Bakterien bei 6000 x g für 10 min wurde das Sediment in 3 ml PBS mit Proteaseinhibitormix Complete von Roche aufgenommen. Die Bakterien wurden mittels der French Press

mechanisch aufgeschlossen. Intakte Bakterien und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 8000 x g für 20 min vom proteinhaltigen Überstand getrennt.

5.2.12 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte mit Hilfe des „Econo-Systems“ der Firma Bio-Rad. Durch die Klonierung von Genen bzw. Genfragmenten in den Expressionsvektor pQE30 enthielten die Proteine einen Anhang von 6 Histidinen am Aminoterminal. Histidin hat eine hohe Affinität zu Nickelionen. Diese Eigenschaft wurde bei der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose genutzt. Die Agarose dient dabei als Trägersubstanz, an das Nitilo-tri-Essigsäure (NTA) gebunden ist. Die NTA komplexiert Nickelionen über vier der möglichen Bindungsstellen des Ions. Zwei Bindungsstellen bleiben jedoch frei, die dann mit den Histidinen interagieren und eine Bindung des gekoppelten Genprodukts an das Säulenmaterial induzieren. Das Protein mit dem His-Tag wurde nach dem Aufschluss der Bakterien mit der French Press freigesetzt und wurde gegen proteolytischen Abbau mit dem Proteaseinhibitormix von Roche geschützt. Die Aufreinigung eines rekombinanten Proteins kann nativ oder denaturierend erfolgen. Die proteinhaltige Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule gegeben. Der Chromatographiepuffer war Trägerflüssigkeit. Die Elution des Proteins auf nativer Basis erfolgte mit Imidazol, welches in der Struktur einem Histidinmolekül ähnelt. In einer Konkurrenzreaktion um die Bindungsstellen des Nickelions werden die Histidine von den Bindungsstellen verdrängt und das rekombinante Proteine wurde von der Säule gespült. Zuerst wurde mit einem niedrigmolaren Imidazolpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene bakterielle Proteine mit einem oder zwei Histidinen von der Säule zu lösen. Zur Elution des rekombinanten Proteins wurde die Imidazol Konzentration sprunghaft erhöht und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Die Proteinkonzentration des Säulendurchflusses wurde dabei bei 280 nm photometrisch verfolgt. Bei der denaturierenden Aufreinigung wurde über den pH-Wert eluiert. Die Bindung der Proteine an die Säule erfolgte mit einem denaturierende Chromatographiepuffer bei einem pH von 8. Die Histidinreste des rekombinanten Proteins besitzen einen pK_a von 6,0 und werden protoniert, wenn der pH gesenkt wird (pH 4,5 – 5,3). Durch die Protonierung kann das 6xHis-tagged Protein nicht länger an der Säule binden und das Protein wird eluiert. Um auch hier eventuell gebundene nicht-rekombinante Proteine von der Säule zu waschen wurde mit Chromatographiepuffer gewaschen dessen pH-Wert bereits abgesenkt war (pH 6,3). Die eigentliche Elution erfolgte bei einem pH-Wert von 4,5. Auch hier wurde das Eluat fraktioniert aufgefangen. Der

Proteingehalt und die Reinheit der Eluatfraktionen wurde anschließend im 12 % SDS-Gel überprüft. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration und Reinheit vereinigt.

Tabelle 5.9 : Chromatographiepuffer für die native Aufreinigung

Chromatographiepuffer a, pH 8	
50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g/l
300 mM NaCL	17,6 g/l
Waschpuffer b, pH 8	
50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g/l
300 mM NaCL	17,6 g/l
20 mM Imidazol	1,36 g/l
Elutionpuffer c, pH 8	
50 mM NaH ₂ PO ₄	6,9 g/l
300 mM NaCL	17,6 g/l
250 mM Imidazol	17 g/l

Tabelle 5.10 : Chromatographiepuffer für die denaturierende Aufreinigung

Chromatographiepuffer A, pH 8	
100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g/l
10 mM TrizmaBase	1,2 g/l
8 M Harnstoff	480,5 g/l
Waschpuffer B, pH 6,3	
100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g/l
10 mM TrizmaBase	1,2 g/l
8 M Harnstoff	480,5 g/l
Elutionpuffer C, pH 4,5	
100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g/l
10 mM TrizmaBase	1,2 g/l
8 M Harnstoff	480,5 g/l

5.2.13 Proteindialyse

Eine Dialyse wurde durchgeführt, um Proteine in einen anderen Puffer zu überführen. Die Proteinlösung wurde in eine Slide-A-Lyzer Kassette mit MWCO von 3,5 kDa gegeben und

über Nacht bei 4°C unter leichten Rühren in 1 L des gewünschten Puffers dialysiert. Bei der Überführung von Proteinen aus hochmolaren Harnstoffpuffern in niedrigmolare Harnstoffpuffer wurde eine stufenweise Dialyse durchgeführt, um eine Proteinpräzipitation zu vermeiden. Die Dialyse erfolgte bis zu einer Konzentration von 4 M Harnstoff bei Raumtemperatur, um eine Verfälschung der Pufferkonzentration durch kristallinen Harnstoff zu vermeiden..

5.2.14 Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Proteinspots aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde die massenspektrometrische Analyse angewandt. Die zu analysierenden Proteine wurden dazu mit Trypsin verdaut und die Massen der spezifischen Peptide durch matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight (MALDI-TOF) bestimmt. Der Peptidmassenfingerabdruck ermöglichte dann die Identifizierung des Proteins durch die Suche in einer Datenbank, die die translatierte Genomsequenz von *S. pneumoniae* enthielt, welche für die Suche virtuell mit Trypsin verdaut wurde.

5.2.14.1 Verdau der Proteine und Elution der Peptide

Das Gel aus dem die Proteinspots ausgeschnitten werden sollten, wurde gründlich mit Milli Q Wasser gewaschen. Alle Arbeitsgänge wurden mit Wasser gespülten Handschuhen durchgeführt, um Verunreinigungen mit Keratin und Polymeren wie PEG zu vermeiden. Die ausgeschnittenen Proteinspots wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 600 µl Milli Q Wasser für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Gel mit Acetonitril (ACN) dehydriert. 200 µl ACN wurden zu dem Gelstück pipettiert und das Gefäß angeschnippt bis sich das Gel langsam weiß färbte. Die Probe wurde zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen. Anschließend wurde zur Umpufferung 200 µl 0,1 M NH_4HCO_3 zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der Überstand wurde vollständig entfernt und es wurde nochmals mit 200 µl ACN dehydriert. Nach dem Dehydrieren wurde das ACN entfernt und das Gelstück für 15 min in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Probe wurde anschließend mit Verdaulösung (25µl-30µl) überschichtet und 10 min auf Eis rehydriert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur ersten Elution wurde das gleiche Volumen ACN (30 µl) zugegeben und 15 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Der Überstand dieser basischen Elution wurde in ein neues 1,5 ml

Reaktionsgefäß gegeben und parallel zur sauren Elution im Vakuum-Konzentrator auf ca. 10 µl Volumen eingeeengt. Das Gelstück wurde währenddessen mit 30 µl 5 % Ameisensäure überschichtet und in 15 min bei 37°C im Schüttelheizblock rehydriert. Im sauren Milieu wurde nun die zweite Elution durch Zugabe von 30 µl ACN gestartet, die ebenfalls 15 min dauerte und bei 37°C unter Schütteln durchgeführt wurde. Der Überstand der sauren Elution wurde anschließend mit der eingeeengten Probe aus der basischen Elution vereinigt und wieder im Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von ca. 10 µl verringert. Für die anschließende Entsalzung der Probe wurde Waschlösung (2 % Methanol, 0,5 % Ameisensäure) bis zu einem Endvolumen von ca. 20 µl zugegeben und 5 min im Ultraschallbad behandelt.

Herstellung der Verdaulösung

Zur Herstellung der Verdaulösung wurde Sequenzing grade modified Trypsin von Promega verwendet. Ein Aliquot von 20 µg Enzym wurde in 100 µl Essigsäure (vom Hersteller mitgeliefert) gelöst und 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 1:100 in 50 mM NH_4HCO_3 verdünnt und die fertige Verdaulösung in Aliquots bei -20°C gelagert.

5.2.14.2 Aufreinigen und Entsalzen der Peptide

Zur Entsalzung und Aufreinigung der Peptide wurden µZipTips der Firma Millipore verwendet. Sie enthielten ein Mikrobett mit hydrophoben C_{18} Säulenmaterial. Das Säulenmaterial wurde durch dreimaliges Aufziehen von je 10 µl Equilibrierungslösung (65 % Methanol, 0,5 % Ameisensäure) aktiviert und anschließend durch dreimaliges Aufziehen von je 10 µl Waschlösung gereinigt. Die Peptide der Probe wurden an das Säulenmaterial gebunden, indem 15-20 mal 10 µl der Peptidlösung langsam eingezogen und anschließend das µZipTip wieder entleert wurde. Die Reinigung der Peptide im Säulenmaterial erfolgte durch dreimaliges Aufziehen von je 10 µl Waschlösung. Beim letzten Aufziehen der Waschlösung wurde das µZipTip nicht entleert, sondern die Pipette erst auf ein Elutionsvolumen von 2 µl eingestellt. Die restliche Waschlösung wurde vorsichtig herausgedrückt und die Matrixlösung (10 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 600 µl 0,1 % Trifluoressigsäure und 400 µl Acetonitril) anschließend aufgezogen. Die Elution der Peptide erfolgte direkt auf das metallische Dünnschichttarget für die MALDI-TOF-MS Analyse. Dort erfolgte die Kokristallisation der Matrixsubstanz mit den Peptiden und die Analyse im Ultraflex TOF/TOF von Bruker.

5.2.14.3 MALDI-TOF-MS

Bei dem Matrix-unterstützten Laserdesorptions/ionisationsverfahren (MALDI) wird die Probe mit einem großen Überschuss einer Matrix verdünnt und einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgt durch Bestimmung der Ionen-Flugzeit (time of flight – TOF) in einem Flugzeit-Massenspektrometer. Zusätzlich lassen sich über den metastabilen Zerfall desorbierte Molekülionen, welcher in der feldfreien Driftregion eines Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometers stattfindet, strukturelle Informationen ermitteln (wie z.B. Peptidsequenzen).

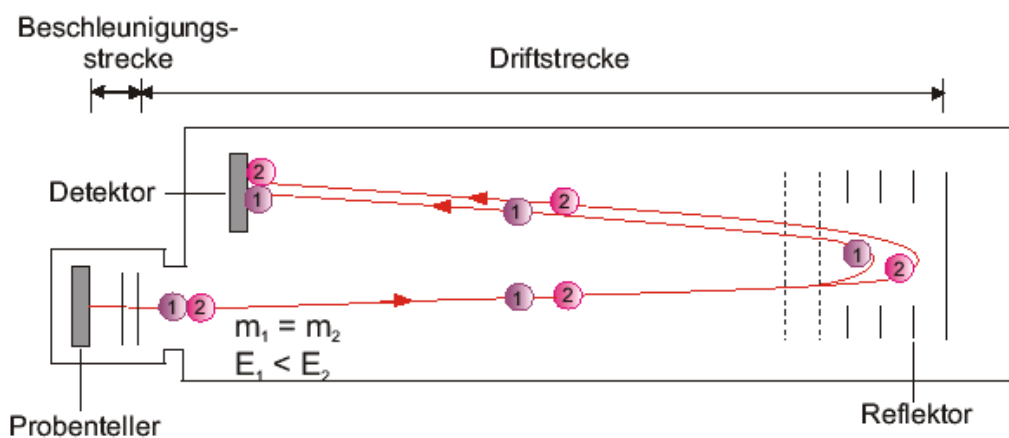


Abb. 5.4: Schematische Darstellung eines MALDI-Massenspektrometers

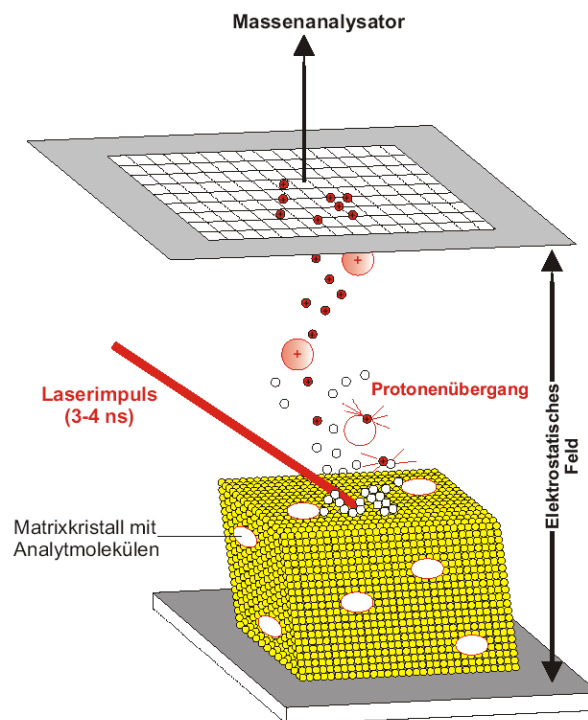


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung des Prinzips der Ionisierung und Flugzeitmessung

5.2.14.4 Auswertung der Massenspektren

Die automatische Detektion der Peaks in den Massenspektren erfolgte mit dem Programm X-Mass von Bruker. Zur Auswertung der Massenspektren und der automatischen Datenbanksuche wurde das Programm BiTools von Bruker verwendet, welches eine Kombination mit der Software von X-Mass erlaubte, um manuelle Nachbesserungen in der Peakdetektion der Massenspektren zu ermöglichen. Der bei BiTools verwendete Algorithmus bei der Proteinidentifizierung wurde von Mascot (www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF) bereitgestellt und die verwendete Datenbank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Eine Peptidtoleranz von 100 ppm wurde zur Identifikation eingestellt.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Plasmide

Zur Klonierung der Fragmente wurde das Plasmid pCR2.1 von Invitrogen mit einer Größe von 3,9 kb verwendet. Das Plasmid enthält Gene für eine Ampicillin- (50 µg ml⁻¹) und eine Kanamycin-Resistenz (50 µg ml⁻¹). Die Transformation des Plasmids erfolgte in *E. coli* TOP10 von Invitrogen transformiert. Danach erfolgte eine Subklonierung der Fragmente in das Plasmid pQE30 von QIAGEN mit einer Größe von 3,4 kb. Dieses Plasmid enthielt ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz (100 µg ml⁻¹). Die Transformation erfolgte in *E. coli* M15.

5.3.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG und Invitrogen bezogen. Sie wurden in einer Endkonzentration von 100 pmol/µl in ddH₂O und in Konzentrationen zwischen 10 pmol und 20 pmol in einem PCR-Volumen von 50 µl eingesetzt. Die Primersequenz wurde so gewählt, dass die Länge der Primer und der Gehalt an GC- bzw. AT-Paaren eine Annealing-Temperatur zwischen 55°C und 65°C ermöglichte.

Tabelle 5.11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz 5'→3'	Acess. Nr.	Position
DAB1 for (<i>Bam</i> HI)	31 →	<u>GGATCC</u> CTCAAAAAATCCTATGGACAAAACG	spr0408	31-56
DAB2 rev (<i>Hind</i> III)	31 ←	<u>AAGCTT</u> TTATTTGAGATAGCGTTGAAGGAAC	spr0408	716-741
promo-dab-for (<i>Bam</i> HI)	26 →	<u>GGATCC</u> GGAAGTCCCAAGCTTTCGG	AE008420	7897-7878
mut-rot-rev (<i>Sma</i> I)	41 ←	(GC) ₆ <u>CCCGGG</u> CCATCAGTTGGTGTTCAGTAG	spr0408	156-179
mut-green-forw (<i>Sma</i> I)	40 →	(GC) ₆ <u>CCCGGG</u> CTGTCCTAAAACGCGAACGCAC	spr0408	322-344
spc1-xmaI (<i>Sma</i> I)	38 →	CCCGG <u>CCCGGG</u> CCCGGATCGATTTTCGTTCGTGAATA	M69221	1-21
spc2-xmaI (<i>Sma</i> I)	37 ←	GCGCC <u>CCCGGG</u> CGGCCCATAGAAATGAATATTTCCC	M69221	1110-1121
glnHF4 (<i>Bam</i> HI)	30 →	<u>GGATCC</u> TTGATCAAGTAGAACCTGGTTTC	spr0409	1-24
glnHF5	23 →	CCGTGGTACGCCAATGATTGTTC	spr0409	557-580
glnHR2 (<i>Sal</i> I)	33 ←	<u>GTCGAC</u> TTATTTCAAATCCTCCGTTTGCAATTG	spr0409	909-936
glnQF1 (<i>Bam</i> HI)	36 →	<u>GGATCC</u> TTGACACAAGCAATCCTTGAAATTAAACAC	spr0408	1-30
glnQF2	30 →	ATGACACAAGCAATCCTTGAAATTAAACAC	spr0408	1-30
glnQR1	25 ←	TTATTTGAGATAGCGTTGAAGGAAC	spr0408	156-179
glnQR2	23 ←	CCATCAGTTGGTGTTCAGTAG	spr0408	716-741

5.3.3 Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Eine einfache und effektive Methode, um DNA-Fragmente voneinander zu trennen ist die Agarosegelelektrophorese, die sowohl bei qualitativen als auch bei quantitativen Analysen eingesetzt werden kann. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden 0,8 – 2,0 % Agarosegele in TAE als Elektrodenpuffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Längen- und/oder Massenstandard auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 Volt. Die DNA wurde mittels des interkalierenden Farbstoffes

Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden durch das Videoauswertungssystem „E.A.S.Y.-System“ von Herolab dokumentiert.

5.3.4 Photometrische Vermessung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und der Grad der Verunreinigung durch Proteine wurde photometrisch durchgeführt. Dabei wurde die Absorption der verdünnten Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA und RNA 40 µg/ml. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der Peptidbindung) bestimmt. Der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Je kleiner der Wert war, desto höher war der Grad der Verunreinigung.

5.3.5 Polymerasekettreaktion (PCR, Saiki et al., 1985)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Vervielfältigung bestimmter DNA Sequenzbereiche verwendet. Mit Hilfe zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) gegensätzlicher Orientierung konnten größere Mengen dieser Sequenzbereiche amplifiziert und für andere molekularbiologische Methoden verwendet werden. Die Reaktion wurde in einem PCR Thermocycler von Biometra durchgeführt. Der erste Schritt war die Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template), das heißt die Trennung des Doppelstranges. Im zweiten Schritt erfolgte das Annealing der Primer, also die Hybridisierung der Oligonukleotide mit den homologen Bereichen auf dem Template. Die Elongation, das heißt die Amplifizierung der spezifischen DNA-Bereiche durch die Polymerase war der dritte und letzte Schritt der Reaktionsabfolge. Diese Reaktionsabfolge wurde 30 – 35 mal durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 50 µl und enthielt neben 100 ng Template-DNA, 10x Reaktionspuffer mit 1,5 mM $MgCl_2$, je 20 pmol Primer-DNA, 100 µM dNTP-Mix und 1 U Taq-DNA-Polymerase von QIAGEN. Alternativ zur Taq-Polymerase wurde auch die Vent_R DNA Polymerase von New England Biolabs verwendet, die eine 3'→5' proofreading Exonuclease Aktivität besaß. Die Durchführung einer PCR begann mit einem vierminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C. In den folgenden repetitiven Zyklen dauerte die Denaturierung 30 sek. Das Annealing erfolgte für 30 sek bei einer Temperatur zwischen 50°C-65°C, welche sich nach den Primern richtete. Die Elongation wurde bei 72°C durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Genbereichs, wobei für 1 kb Fragmentgröße eine Elongationszeit von 1 min berechnet wurde.

Zum Abschluss der Reaktion wurde einmalig eine vierminütige Elongationsphase bei 72°C durchgeführt, die die Vervollständigung angefangener Amplifikate gewährleisten sollte. Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel mit einem 1 kb-Ladder als Größenstandard.

5.3.6 Präparation von DNA

5.3.6.1 Präparation von genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae*

Mit Hilfe der Genomic Midi Tip 100/G Säulen von QIAGEN und den dazugehörigen Puffern wurde die chromosomale DNA der Pneumokokken isoliert. Dazu wurden die verschiedenen Pneumokokken-Stämme in 20 ml THY bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert und bei 6000 x g für 10 min sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in 3,5 ml Puffer B1 mit 0,25 mg RNase resuspendiert und zur Verbesserung der Bakterienlyse wurde zusätzlich mit 1,25 mg Lysozym, 2,5 mg Pronase E und 250 U Mutanolysin bei 37°C für 30 min inkubiert. Um vorhandene Proteine zu denaturieren, wurde danach 1,2 ml Puffer B2 zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte über die schon erwähnten Genomic Midi Tip 100/G Säulen nach dem Herstellerprotokoll. Das gereinigte DNA-Präzipitat wurde dann in 200 µl Milli Q Wasser resuspendiert werden und wurde anschließend photometrisch vermessen und die Reinheit im 1 % Agarosegel kontrolliert.

5.3.6.2 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAGEN Mini Kit oder dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II von Peqlab aus über Nacht kultivierten *E. coli*-Kulturen in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte photometrisch.

5.3.7 Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel

Die DNA bzw. DNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Die gewünschten Fragmente wurden sorgfältig aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA dann mit dem DNA-Gelextraction Kit von QIAGEN nach

Herstellerprotokoll aufgereinigt. Eine Reinheitskontrolle wurde anschließend durch Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegels durchgeführt.

5.3.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden von den anderen Bestandteilen der PCR-Reaktion mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit isoliert. Das Kit wurde nach den Protokollangaben des Herstellers verwendet. Die Elution der PCR-Fragmente von der Ionenaustauschersäule erfolgte in einem Volumen von 50 µl.

5.3.9 Klonierungs-Methoden

5.3.9.1 Klonierung von PCR-Produkten

Eine sehr schnelle und einfache Methode, um mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente in einen Vektor zu integrieren, ist die Klonierung mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen. Bei der Amplifizierung von PCR-Produkten mit der Taq-DNA-Polymerase entstanden am Ende der Amplifikate A-Überhänge, die direkt mit den im Topo[®] Vektor enthaltenen T-Überhängen ligieren konnten. Der Ligationsansatz wurde in One Shot[®] Chemically Competent TOP10 *E. coli* von Invitrogen transformiert, indem die Bakterien zusammen mit dem Ligationsansatz einem Hitzeschock von 30 sek bei 42°C ausgesetzt wurden, kurz auf Eis gekühlt und in 250 ml SOC-Medium resuspendiert wurden. Nach einer einstündigen schüttelnden Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz auf LB-Bactoagarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (s. Antibiotikaresistenzgene bei den Plasmiden und 80 µg/ml X-gal) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erscheinen Bakterienkolonien, die ein DNA-Fragment integriert haben weiß. Das Fragment integriert in das LacZ-Gen des Vektors und zerstört dadurch seine Funktion. Kolonien, die blau erscheinen enthalten ein intaktes LacZ-Gen und haben kein Insert. Für die Blau-Färbung der Kolonien ist X-gal als Substrat notwendig. Die Farbreaktion erleichterte die Selektion auf erfolgreiche Transformanten.

5.3.9.2 DNA-Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, um DNA an definierten Sequenzstellen zu schneiden. Die Enzyme haben eine spezifische Erkennungssequenz, die erkannt werden und einen Strangbruch an dieser Stelle verursachen. So konnten definierte DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA, chromosomaler DNA oder PCR-Fragmenten herausgeschnitten und in einen Vektor kloniert werden. Die Reaktionstemperatur, Verdaulänge und der Verdaupuffer sind für jedes Enzym spezifisch und vom Hersteller angegeben. Die Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 20 µl und enthielten 2 µl 10x Puffer, 1U Restriktionsenzym pro µg DNA und 0,5 – 5 µg DNA.

Verwendete Restriktionsenzyme :

BamHI (20000 U ml⁻¹) G↓GATCC

EcoRI (10000 U ml⁻¹) G↓AATTC

HindIII (20000 U ml⁻¹) A↓AGCTT

SmaI (20000 U ml⁻¹) CCC↓GGG

XmaI (20000 U ml⁻¹) CC↓CGGG

5.3.9.3 Dephosphorylierung

Der linearisierten Vektors wurde mit alkalischer Phosphatase (AP) aus dem Kälberdarm (CIP) behandelt, um bei einer Klonierung die Religation des Vektors zu vermeiden. Das Enzym katalysierte die Hydrolyse der freien 5'-Phosphatenden von Nukleinsäuren und verhinderte dadurch die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung. Im vom Hersteller empfohlenen Dephosphorylierungspuffer wurde der linearisierte Vektor für eine Stunde bei 37°C mit 1 U AP behandelt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend durch 15 min Erhitzen auf 75°C.

5.3.9.4 Ligation

Bei der Ligation wurden die Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen gebildet, die beide DNA-Stücke zu einem Fragment bzw. einem Plasmid verbindet. Das Standardenzym für diese Reaktion ist die T4 DNA Ligase, welche die 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende mit der 3'-OH-Gruppe an dem anderen Ende kovalent verknüpft. Die Reaktion erfolgte bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 10 µl. Der Ansatz enthielt 1µl 10x Ligasepuffer, 400 U T4 DNA Ligase von New England Biolabs und je 100 ng vom linearisierten Vektor und

dem DNA-Fragment. Bei einer „blunt end“ Ligation, also einer Ligation bei der an den beiden zu ligierenden DNA-Fragmenten keine Nukleotid-Überhänge vorhanden sind, wurde Vektor zu DNA-Fragment im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Das ligierte Plasmid konnte anschließend in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert werden.

5.3.10 Methoden zur Transformation von Bakterien

5.3.10.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Bakterien wurden mit MgCl_2 behandelt, um diese kompetent zu machen, das heißt aufnahmefähig für DNA. Dazu wurde einer über-Nacht-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes in LB-Medium kultiviert, 1/100 mit frischem LB-Medium verdünnt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,5-0,6) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min auf Eis gestellt und bei 4°C bei 5000 x g für 10 min sedimentiert. Die Bakteriensedimente wurden in 1/10 des Ausgangsvolumens mit TSS (10 % PEG 3350, 5 % DMSO, 20 mM MgCl_2 , in LB-Medium) resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.3.10.2 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und 10-500 ng Plasmid-DNA oder 5-7 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s, der die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle unterstützt. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 1 min wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 Stunde schüttelnd bei 37°C inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. 150 µl und 250 µl des Ansatzes wurden auf Antibiotikahaltige LB-Bactoagar-Platten verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.3.10.3 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Pneumokokken weisen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA auf (Avery *et al.*, 1931), die durch Zugabe des Kompetenz-stimulierenden Peptides (CSP) induziert wird. Ausgehend von einer frischen Blutagarkultur wurden die Pneumokokken in 5 ml CpH8-

Medium bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,15 bei 37°C kultiviert. Nach Zugabe von 1 µl CSP 1 mg ml^{-1} wurden die Bakterien für weitere 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein kurzer Kältschock für 4 min auf Eis. 250 µl der Bakteriensuspension wurde mit 1 µg der zu transformierenden DNA für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde nicht aufgenommene DNA durch Zugabe von 2,3 U DNase abgebaut und die Suspension zur Regeneration der transformierten Pneumokokken für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf antibiotikahaltigen Blutagarplatten ausplattiert, die zuvor mit 5 ml THY-Top-Agar überschichtet worden waren. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C kultiviert. Transformanden wurden am folgenden Tag auf frische Blutagarplatten mit erhöhter Antibiotikakonzentration zur weiteren Selektion überimpft. Die Kontrolle der Transformation erfolgte durch Restriktionsanalyse der genomischen DNA.

5.3.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism Big Dye Terminator V 1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977). Durch zu der PCR-Reaktion zugesetzte fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotiden, die keine 3'-OH-Gruppe besitzen, wurde eine gezielte, aber statistisch verteilte Unterbrechung der Komplementärstrangsynthese verursacht. Dieses Unterbrechungsmuster konnte direkte Informationen über die DNA-Sequenz liefern. Bevor jedoch der Sequenzieransatz durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden konnte, wurden die markierten PCR-Produkte mit dem Dye Ex Spin Kit von QIAGEN aufgereinigt. Nach der Kapillarelektrophorese wurden die Elektropherogramme mit dem Programm SeqMan (DNA-Star, Lasergene) ausgewertet.

5.3.12 Southern Blot (Southern, 1975)

Mit Hilfe des Southern Blots konnte durch eine sich anschließende Hybridisierung mit spezifische DNA-Sonden die homologen DNA-Abschnitte aus einem komplexen DNA-Gemisch detektiert werden. Dazu wurde die chromosomale DNA der Bakterien mit dem Restriktionsenzym *HindIII* über Nacht verdaut und die DNA im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren. Eine Inkubation in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl gewährleistete eine

vollständige Denaturierung der DNA. Zum Schluss wurde noch in 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl für 2x 15 min neutralisiert, bevor das Gel in 20 x SSC äquiliert wurde. Für den Southern Blot wurden die aufgetrennten Fragmente in einer Vakuum-Blot-Apparatur auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Als Blotpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Danach wurde die DNA mit dem UV-Stratalinker von Stratagene mit der Membran quervernetzt.

5.3.13 DNA-DNA-Hybridisierung

Nach dem Southern Blot wurden die auf der Membran fixierten DNA-Fragmente mit den entsprechenden DIG-Sonden hybridisiert werden. Dazu wurde die Membran zuerst im vorgewärmten Hybridisierungsröhrchen in 10 ml High-SDS-Puffer (bei 42°C für 2 Stunden äquiliert. Anschließend folgte die Hybridisierung mit 10 ng/ml der denaturierten DIG-Sonde (5 min bei 99°C) und 100 µl Lachssperm-DNA über Nacht bei 42°C in High-SDS-Puffer. Die Lachssperm-DNA wurde zugesetzt, um unspezifische DNA-Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal in 2 x SSC mit 0,1 % SDS für 10 min bei Raumtemperatur und zweimal in 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS für 15 min bei 64°C gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 5 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7.5) geschwenkt und 30 min in Absättigungspuffer (1% Blockierungsreagenz von Roche in 0,1 M Maleinsäure) inkubiert. Zur Detektion der Dioxigenin markierten Sonden wurde ein mit alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Dioxigenin Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde für 30 min in Absättigungspuffer inkubiert. Unspezifische Antikörperbindung wurde durch zweimaliges 15 minütiges schwenken in Waschpuffer wieder entfernt. Der Blot wurde 3 x 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tri-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) geschwenkt. Die Detektion erfolgte über zugesetztes CSPD. CSPD ist ein Substrat der alkalischen Phosphatase und wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Die gebundenen Sonden konnten nach der enzymatische Reaktion durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

5.3.14 Herstellung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA zur Generierung spezifischer Sonden erfolgte durch den Einbau des Nukleotidanalogs Digoxigenin-Desoxyuridinphosphat (Dig-dUTP) im Zuge einer PCR. Dafür wurde das gewünschte DNA-Fragment zunächst via PCR amplifiziert, mittels des Gel Extraction Kits von QIAGEN aus dem Gel eluiert und anschließend in einer nachfolgenden

PCR, in dem der Dig-dUTP-labeling Mix (Boehringer) eingesetzt wurde, erneut amplifiziert. Die fertigen DIG-Sonden wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

5.3.15 Computerunterstützte Datenanalyse

DNA-Sequenzanalysen wurden mit den Programmen EditSeq und SeqMan von Lasergene vorgenommen. Zur Analyse von Sequenzhomologien und funktionellen Genbereichen wurden das Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) [Altschul *et al.*, 1990] verwendet. Für Datenbankvergleiche wurden am „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) unter www.ncbi.nlm.nih.gov durchgeführt. Analysen auf Proteinebene erfolgten mit Hilfe des „Expert Protein Analysis System Molecular Biology Server“ (www.expasy.ch). Die Daten aus der Sequenzierung eines Typ 4 *Streptococcus pneumoniae*-Stammes wurden vom Institute for Genomic Research (TIGR) über ftp://ftp.tigr/pub/datas/s_pneumoniae bezogen. Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Software-Pakets Microsoft Office 2000, die Tabellen und Graphiken mit dem Programm Excel 2000 erstellt.

5.4 Mauseinfektion

10-11 Wochen alte Balb/C Mäuse wurden subdermal mit einem Inokulum von $\sim 10^5$ Bakterien pro Maus infiziert. Für die Bestimmung der Überlebenszeit wurde 8 Mäuse pro Gruppe über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet.

6. Literatur

Adams M. H., Roe A. S. (1945) A partially defined medium for cultivation of pneumococcus. *J. Bacteriol.* **49**: 401-409.

AlonsoDeValesco, E., Verheul, A.F.M., Verhoef, J., Snippe, H. (1995) *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Micobiol. Rev.* **59**: 591-603.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Anderson L., Seilhamer J. (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18 (3-4)**: 533-537.

Antelmann H., Darmon E., Noone D., Veening J.-W., Westers H., Bron S., Kuipers O.P., Devine K.M., Hecker M., van Dijk J.M. (2003) The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Mol Microbiol* **49(1)**:143-156.

Antelmann H., Yamamoto H., Sekiguchi J., Hecker M. (2002) Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: A proteomic approach. *Proteomics* **2(5)**: 591-602

Appel R.D., Sanchez J.-C., Bairoch A., Golaz O., Ravier F., Pasquali C., Hughes G.J., Hochstrasser D.F. (1994) The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **22**: 3581-3582

Bensing B.A., Sullam P.M. (2002) An accessory sec locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets. *Mol Microbiol.* **44 (4)**: 1081-1094.

Berggren K.N., Schulenberg B., Lopez M.F., Steinberg T.H., Bogdanova A., Smejkal G., Wang A., Patton W.F. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* **2(5)**: 486-498

Bergmann S., Rohde M., Chhatwal G.S., Hammerschmidt S. (2001) α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasminogen-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40**: 1273-1287.

Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun.* **72 (4)**: 2416-2419.

- Berry A.M., Lock R.A., Paton J.C.** (1996) Cloning and characterization of nanB, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178** (16): 4854-4860.
- Berry A.M., Paton J.C.** (1996) Sequence heterogenicity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **64**: 5255-5262.
- Blue C.E., Paterson G.K., Kerr A.R., Berge M., Claverys J.P., Mitchell T.J.** (2003) ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect Immun.* **71** (9): 4925-35.
- Bork P., Bairoch A.** (1996) Go hunting in sequence databases but watch out for the traps. *Trends Genet.* **12** (10): 425-427.
- Boulnois G.-J.** (1992) Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 249-259.
- Brandis, J., Köhler, W., Eggers, H.J., and Pulverer, G.** (1994) Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag.
- Brown J.S., Gilliland S.M., Ruiz-Albert J., Holden D.W.** (2002) Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infect Immun.* **70** (8): 4389-4398.
- Bruyn, G.A.W., Zegers, B.J.M., and van Furth, R.** (1992) Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* **14**:251-262.
- Camara M., Boulnois G.J., Andrew P.W., Mitchell T.J.** (1994) A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* **62**(9): 3688-3695.
- Campo N., Tjalsma H., Buist G., Stepniak D., Meijer M., Veenhuis M., Westermann M., Muller J.P., Bron S., Kok J., Kuipers O.P., Jongbloed J.D.** (2004) Subcellular sites for bacterial protein export. *Mol Microbiol.* **53** (6):1 583-1599.
- Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud T.** (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**(11):1901-1909.
- Chiavolini D., Memmi G., Maggi T., Iannelli F., Pozzi G., Oggioni M.R.** (2003) The three extra-cellular zinc metalloproteinases of *Streptococcus pneumoniae* have a different impact on virulence in mice. *BMC Microbiology*

- Chu P.-W., Yap M.-N., Wu C.-Y., Huang C.-M., Pan F.-M., Tseng M.-J., Chen S.-T.** (2000) A proteomic analysis of secreted proteins from xylan-induced *Bacillus* sp. strain K-1. *Electrophoresis* : 1740-1745
- Chudwin D.S., Artrip S.G., Korenblit A., Schiffman G., Rao S.** (1985) Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **50**: 213-217.
- Collen D., Verstraete M.** (1975) Molecular biology of human plasminogen.II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb Diath Haemorrh* **34**: 403-408.
- Corthals G.L., Molloy M.P., Herbert B.R., Williams K.L., Gooley A.A.** (1997) Prefractionation of protein samples prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 317-23.
- Cull M., McHenry C.S.** (1990) Preparation of extracts from prokaryotes. *Methods Enzymol.* **182**: 147-53.
- Dave S., Carmicle S., Hammerschmidt S., Pangburn M.K., McDaniel L.S.** (2004) Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J Immunol.* **173** (1): 471-477.
- Diaz E., Garcia E., Ascarso C., Mendez E., Lopez R., Garcia J.L.** (1989) Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1238- 44.
- Dintilhac A., Alloing G., Granadel C., Claverys J.P.** (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**: 727-739.
- Exner M.M., Doig P., Trust T.J., Hancock R.E.W.** (1995). Isolation and Characterization of a Family of Porin Proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**:1567-1572
- Fedson, D.S.** (1999) The clinical effectiveness of pneumococcal vaccination: a brief review. *Vaccine* **1**: 85-90.
- Feldmann C., Mitchell T. J., Andrew P. W., Boulnois G. J., Read R. C., Todd H. C., Cole P. J., Wilson R.** (1990) The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Patogen* **9**: 275-284

- Fichmann J.** (1999) Advantage of immobilized pH gradients. *Methods Mol Biol.* **112**: 173-174.
- Fine, D.P.** (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* **12**:772-778.
- Fountoulakis M., Takács B.,** (2001) Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* **22 (9)**: 1593-1602
- Garcia P., Garcia J.L., Garcia E., Lopez R.** (1986) Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promotor in Escherichia coli. *Gene* **43**: 265-272.
- Geelen S., Bhattacharyya C., Tuomanen E.** (1993) The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun.* **61**: 1538-1543.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W.** (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21(9)**: 1037-1053
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W.** (1999) Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20(4-5)**: 712-717
- Görg A., Postel W., Friedrich C., Kuick R., Strahler J.R., Hanash S.M.** (1991) Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. *Electrophoresis* **12**: 653-658
- Görg A., Postel W., Günther S.** (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546
- Gosink K.K., Mann E.R., Guglielmo C., Tuomanen E., Masure H.R.** (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 5690-5695.
- Hammerschmidt S., Bethe G., Remane P.H., Chhatwal G.S.** (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt S., Talay S.R., Brandtzaeg P., Chhatwal G.S.** (1997) SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25 (6)**: 1113-1124.

- Hammerschmidt S., Tillig M.P., Wolff S., Vaerman J.-P., Chhatwal G.S.** (2000) Species specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* **36**: 726-736.
- Harder A., Wildgruber R., Nawrocki A., Fey S.J., Mose Larsen P., Görg A.** (1999) Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20** (3): 826-829
- Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C.** (1979) Properties of Detergents. *Methods in Enzymology* **56**: 734-749
- Herbert B.** (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20** (4-5): 660-663
- Hillenkamp F., Karas M.** (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* **193**: 280-95.
- Hiller K., Schobert M., Hundertmark C., Jahn D., Münch R.** (2003) JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3862-3865
- Hochstrasser DF, Harrington MG, Hochstrasser AC, Miller MJ, Merrill CR.** (1988) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173** (2): 424-435
- Holmes A.R., McNab R., Millsap K.W., Rohde M., Hammerschmidt S., Mawdsley J.W., and Jenkinson, H.F.** (2001) The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectinbinding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* **41**: 1395-1408.
- Hoskins J., Alborn W.E. Jr, Arnold J., Blaszcak L.C., Burgett S., DeHoff B.S., Estrem S.T., Fritz L., Fu D.J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J.S., Khoja H., Kraft A.R., Lagace R.E., LeBlanc D.J., Lee L.N., Lefkowitz E.J., Lu J., Matsushima P., McAhren S.M., McHenney M., McLeaster K., Mundy C.W., Nicas T.I., Norris F.H., O'Gara M., Peery R.B., Robertson G.T., Rockey P., Sun P.M., Winkler M.E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C.A., Baltz R.H., Jaskunas S.R., Rosteck P.R. Jr, Skatrud P.L., Glass J.I.** (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* **183** (19): 5709-17.
- Houldsworth S., Andrew P.W., Mitchell T.J.** (1994) Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1- beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* **62**: 1501-1503

- Hughes M.J.G., Moore J.C., Lane J.D., Wilson R., Pribul P.K., Younes Z.N., Dobson R.J., Everest P., Reason A.J., Redfern J.M., Greer F.M., Paxton T., Panico M., Morris H.R., Feldman R.G., Santangelo J.D.** (2002) Identification of Major Outer Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **70**: 1254-1259
- Humphrey J.H.** (1948) Hyaluronidase production by pneumococci. *J. Pathol. Bacterio.* **55**: 273-275.
- Johnson M.K.** (1977) Cellular localisation of pneumolysin. *FEMS Microbiol.Let.* **2**: 243-245.
- Johnson M.K., Geoffroy C., Alouf J.E.** (1980) Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun.* **27 (1)**: 97-101.
- Karas M., Hillenkamp F.** (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 **60 (20)**: 2299-2301.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.** (1998) Medizinische Mikrobiologie, 9.Aufl., Thieme Verlag.
- Kerr A.R., Adrian P.V., Estevao S., de Groot R., Alloing G., Claverys J.P., Mitchell T.J., Hermans P.W.** (2004) The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect Immun.* **72 (7)**: 3902-3906.
- Kilian M., Reinholdt J., Lomholt H., Poulsen K., Frandsen E.V.** (1996) Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonisation and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* **104 (5)**: 321-338
- Klose J.** (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26 (3)**:231-243
- Koedel U., Scheld W.M., Pfister H.-W.** (2002) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2(12):721-736
- Kwon H.-Y., Kim S.-W., Choi M.-H., Ogunniyi A.D., Paton J.C., Park S.-H., Pyo S.-N., Rhee D.-K.** (2003) Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71 (7)**: 3757-3765
- Lacks S., Hotchkiss R. D.** (1960) A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* **39**: 508-517

- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685
- Lancefield, R.C.** (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* **57**: 571-595
- Len A.C.L., Cordwell S.J.C., Harty D.W.S., Jacques N.A.** (2003) Cellular and extracellular proteome analysis of *Streptococcus mutans* grown in a chemostat. *Proteomics* (3): 627-646.
- Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A., Portnoy D.A.** (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (21): 12432-12437
- Lenz L.L., Portnoy D.A.** (2002) Identification of a second *Listeria* secA gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol.* **45** (4): 1043-1056.
- Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J., Mizrahi-Nebenzahl Y.** (2004) Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol.* **138** (2): 290-298.
- Lloyd-Evans N., O'Dempsey T., Baldeh I., Secka O., Demba E., Todd J., McCardle T., Banya W., Greenwood B.** (1996) Nasopharyngeal carriage of pneumococci in Gambian children and in their families. *Pediatr Infect Dis J.* **15** (10): 866-871
- Lock R.A., Paton J.C., Hansman D.** (1988) Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog.* **5**: 461-467.
- Lock R.A., Paton J.C., Hansman D.** (1988) Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **4** (1): 33-43.
- Lund E., Henriksen J.** (1978) Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Bergan T., Norris J.R., eds. *Methods in microbiology*. Vol. 12 New York: Academic Press; 241-261.
- McDaniel L.S., Sheffield J.S., Delucchi P., Briles D.E.** (1991) PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* **59**: 222-228.
- Méchin V., Consoli L., Le Guilloux M., Damerval C.** (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**: 1299-1302

- Modun B., Williams P.** (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun.* **67** (3): 1086-1092.
- Molestina R.E., Klein J.B., Miller R.D., Pierce W.H., Ramirez J.A., Summersgill J.T** (2002) Proteomic Analysis of Differentially Expressed *Chlamydia pneumoniae* Genes during Persistent Infection of HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* **70** (6): 2976-2981
- Molloy M.P., Herbert B.R., Walsh B.J., Tyler M.I., Traini M., Sanchez J.-C., Hochstrasser D.F., Williams K.L., Gooley A.A.** (1998) Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 837-844
- Montigiani S., Falugi F., Scarselli M., Finco O., Petracca R., Galli G., Mariani M., Manetti R., Agnusdei M., Cevenini R., Donati M., Nogarotto R., Norais N., Garaguso I., Nuti S., Saletti G., Rosa D., Ratti G., Grandi G.** (2002) Genomic Approach for Analysis of Surface Proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70** (1): 368-379.
- Murray P.R., Drew W.C., Kobayashi G.S., Thompson J.H.** (1990) Medical Microbiology International Student Edition, Wolfe Education Ltd.
- Musher, D.M.** (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* **14**(4):801-807.
- Nukui M., Taylor K.B., McPherson D.T., Shigenaga M.K., Jedrzejewski M.J.** (2003) The function of hydrophobic residues in the catalytic cleft of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. Kinetic characterization of mutant enzyme forms. *J. Biol. Chem.* **278** (5): 3079-88
- O'Farrell P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** (10): 4007-21
- Oggioni M.R., Memmi G., Maggi T., Chiavolini D., Iannelli F., Pozzi G.** (2003) Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol.* **49** (3): 795-805.
- Ogunniyi A.D., Giammarinaro P., Paton J.C.** (2002) The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiology* **148**: 2045-2053.

- Olivieri E., Herbert B., Righetti P.G.** (2001) The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes. *Electrophoresis* **22**(3): 560-565
- Overweg K., Kerr A., Sluijter M., Jackson M. H., Mitchel T. J., de Jong A. P. J. M., de Groot R., Hermanns P. W. M.** (2000) The Putative Proteinase Maturation Protein A of *Streptococcus pneumoniae* Is a Conserved Surface Protein with Potential To Elicit Protective Immune Responses. *Infect. Immun* **68** (7): 4180–4188
- Pancholi V., Fischetti V.A.** (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem.* **273** (23): 14503-14515
- Pasquali C., Fialka I., Huber L.A.** (1997) Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**: 2573-2581
- Plotkowski, M.C., Puchelle, E., Beck, G., Jacquot, J., and Hannoun, C.** (1986) Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am Rev Respir Dis* **134**(5):1040-1044.
- Poland J., Cahill M.A., Sinha P.** (2003) Isoelectric focusing in long immobilized pH gradient gels to improve protein separation in proteomic analysis. *Electrophoresis* **24** (7-8): 1271-1275
- Poulsen K., Reinhold J., Kilian M.** (1996) Characterization of the *S. pneumoniae* Immunoglobulin A1 protease gene (iga) and its translation product. *Infect. Immun.* **64** (10): 3957-3966.
- Rabilloud T.** (1998) Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19** (5): 758-760.
- Rabilloud T., Strub J.-M., Luche S., Girardet J.L., van Dorsselaer A., Lunardi J.** (2000) Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis. *Proteome*
- Rabilloud T., Strub J.-M., Luche S., van Dorsselaer A., Lunardi J.** (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**(5): 699-704

- Rabilloud T., Valette C., Lawrence J.J.** (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**: 1552-1558
- Reinert R.R., Simic S., Al-Lahham A., Reinert S., Lemperle M., Lutticken R.** (2001) Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients with respiratory tract infections in Germany from 1998 to 1999: results of a national surveillance study. *J Clin Microbiol*: 39 (3): 1187–1189
- Rennels M.B., Edwards K.M., Keyserling H.L., Reisinger K.S., Hogerman D.A., Madore D.V., Chang I., Paradiso P.R., Malinoski F.J., Kimura A.** (1998) Safety and Immunogenicity of heptavalent pneumococcal Vaccine conjugated to CRM₁₉₇ in United States infants. *Pediatrics* **101**: 604-611.
- Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J.F., Hoffmann, M.K., and Tuomanen, E.** (1989) Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun* 57:1890-1893.
- Romer T.G., Boyle M.D.P.** (2003) Application of immunoproteomics to analysis of post-translational processing of the antiphagocytic M protein of *Streptococcus*. *Proteomics* : 36-44.
- Rosenkrands I., Weldingh K., Jacobsen S., Hansen C.V., Florio W., Gianetri I., Andersen P.** (2000) Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* **21** (5): 935-948.
- Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R.** (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **25**: 819-829.
- Rossjohn J., Gilbert R. J., Crane D., Morgan P. J., Mitchell T. J., Rowe A. J., Andrew P. W., Paton J. C., Tweten R. K., Parker M. W.** (1998): The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **284** (2): 449-461
- Rubins J.B., Charboneau D., Fasching C., Berry A. M., Paton J. C., Alexander J. E., Andrew P. W., Mitchell T. J., Janoff E. N.** (1996): Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **153**: 1339-1346
- Rubins J.B., Paddock A.H., Charboneau D., Berry A.M., Paton J.C., Janoff E.N.** (1998) Pneumolysin in pneumococcal adherence and colonization. *Microb Pathog.* **25** (6): 337-342.

- Saiki R.K., Scharfs S., Faloona F., Mullis K.B., Hor G.T., Erlich H.A., Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Salysers, A. A., Whitt, D. D.** (1994) Bacterial pathogenesis: a molecular approach, ASM Press, Washington D.C.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sampson J.S., O'Connor S.P., Stinson A.R., Tharpe J.A., Russel H.** (1994) Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun* **62**: 319-324.
- Sanger F., Nickler S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.** (2000) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?. *Electrophoresis* **21** (6): 1054-1070
- Santoni V., Rabilloud T., Doumas P., Rouquié D., Mansion M., Kieffer S., Garin J., Rossignol M.** (1999) Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20** (4-5): 705-711
- Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jansch L., Wehland J., Karst U.** (2004) The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* **4** (10): 2991-3006.
- Schiffman G.** (1983) Pneumococcal vaccine: a tool for the evaluation of the B-cell function of the immun system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **174**: 309-315.
- Schlegel H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Aufl.; Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Shapiro E.D., Berg A.T., Austrian R., Schroeder D., Parcells V., Margolis A., Adair R.K., Clemens J.D.** (1991) The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med.* **325** (21): 1453-1460.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* **68** (5): 850-858.

- Sorensen U.B., Henrichsen J., Chen H.C., Szu S.C.** (1990) Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb Pathog.* **8** (5): 325-334.
- Southern, E.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503–517
- Strahler J.R., Hanash S.M., Somerlot L., Bjellqvist B., Görg A.** (1988) Effect of salt on the performance of immobilized pH gradient isoelectric focusing gels. *Electrophoresis* **9**: 74-80
- Talkington D.F., Brown B.G., Tharpe J.A., Koenig A. und Russell H.** (1996) Protection of mice against fetal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin (PsaA). *Microb. Pathog.* **21**: 17-22.
- Talkington D.F., Crimmins D.L., Voellinger D.C., Yother J., Briles D.E.** (1991) A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. *Infect Immun.* **59** (4): 1285-9.
- Tamura G.S., Nittayajarn A., Schoentag D.L.** (2002) A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect Immun.* **70** (6): 2877-2885.
- Tatusov R.L., Fedorova N.D., Jackson J.D., Jacobs A.R., Kiryutin B., Koonin E.V., Krylov D.M., Mazumder R., Mekhedov S.L., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Smirnov S., Sverdlov A.V., Vasudevan S., Wolf Y.I., Yin J.J., Natale D.A.** (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics.* **4**: 41
- Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J.** (1997) A genomic perspective on protein families. *Science.* **278** (5338): 631-637.
- Tettelin H., Maignani V., Cieslewicz M.J., Eisen J.A., Peterson S., Wessels M.R., Paulsen I.T., Nelson K.E., Margarit I., Read T.D., Madoff L.C., Wolf A.M., Beanan M.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., DeBoy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Lewis M.R., Radune D., Fedorova N.B., Scanlan D., Khouri H., Mulligan S., Carty H.A., Cline R.T., Van Aken S.E., Gill J., Scarselli M., Mora M., Iacobini E.T., Brettoni C., Galli G., Mariani M., Vegni F., Maione D., Rinaudo D., Rappuoli R., Telford J.L., Kasper D.L., Grandi G., Fraser C.M.** (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *PNAS* **99**: 12391-12396

- Thomas T.C., McNamee M.G.**(1990) Purification of Membrane Proteins. *Methods in Enzymology* **182**: 499-520
- Tomasz A, Westphal M.** (1971) Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **68 (11)**: 2627-30.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76 (9)**: 4350-4354.
- Tu A.-H., Fulgham R.L., McCrory M.A., Briles D.E., Szalai A.J.** (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 4720-4724.
- Tuomanen E.I., Austrian M.D., Masure H.R.** (1995) Pathogenesis of Pneumococcal infection. *N Engl J Med.* **332 (19)**:1280-84.
- Tuomanen EI, Prasad SM, George JS, Hoepelman AI, Ibsen P, Heron I, Starzyk RM.** (1993) Reversible opening of the blood-brain barrier by anti-bacterial antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90 (16)**: 7824-7828
- Underdown B.J., Schiff J.M.** (1986) Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* **4**: 389-417.
- van Dam, J.E.G., Flier, A., and Snippe, H.** (1990) Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Antonie Leeuwenhoek* **58**:1-47.
- van de Rijn, I., Kessler R.E.** (1980) Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect. Immun.* **27**: 444-448
- von Kries, R., Siedler, A., Schmitt, H.J., and Reinert, R.R.** (2000) Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* **31(2)** :482-487.
- Vuillard L, Braun-Breton C, Rabilloud T.** (1995) Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification. *Biochem J.* **305 (1)**: 337-343
- Vytvytska O., Nagy E., Blüggel M., Meyer H.E., Kurzbauer R., Huber L.A., Klade C.S.** (2002) Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics* : 580-590
- Walsh B.J., Herbert B.R.** (1999) Casting and running vertical slab-gel electrophoresis for 2D-PAGE. *Methods Mol Biol.* **112**: 245-53.

- Watson, D.A., and Musher, D.M.** (1990) Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58:3135-3138.
- Wildgruber R., Harder A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W., Fey S.J., Larsen P.M., Görg A.** (2000) Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21 (13): 2610-2616
- Wilkins M. R., Williams K. L., Appel R. D. und Hochstrasser D. F.** (1997). Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics *Bioinformatics in protein analysis*. 88: 215-31.
- Wizemann T.M., Heinrichs J.H., Adamou J.E., Erwin A.L., Kunsch C., Choi G.H., Barash S.C., Rosen C.A., Masure H.R., Tuomanen E., Gayle A., Brewah Y.A., Walsh W., Barren P., Lathigra R., Hanson M., Langermann S., Johnson S., Koenig S.** (2001) Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 69 (3): 1593-1598.
- Yoshida K., Kobayashi K., Miwa Y., Kang C., Matsunaga M., Yamaguchi H., Tojo S., Yamamoto M., Nishi R., Ogasawara N., Nakayama T., Fujita Y.** (2001) Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*. 29: 683-692
- Yother J., McDaniel L., Briles D.E.** (1986) Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 168: 1463-1465.
- Zysk G., Schneider-Wald B. K., Hwang J. H., Bejo L., Kim K. S., Mitchell T. J., Hakenbeck R., Heinz H. P.** (2001) Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69 (2): 845-852

7. Anhang**Abkürzungen**

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AmpR	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspirol {1,2-dioxetan – 3,2-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.13.7] decan} –4yl) phenylphosphat
C	Cytosin
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
dH ₂ O	eionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EryR	Erythromycin-Resistenz
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
g	Gramm
G	Guanin
GST	Gluthation-S-transferase
h	Stunde
His-tag	6 Histidin-Aminosäuren
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KanR	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KFE	Kolonieformierende Einheiten
Konz.	Konzentration
L	Liter
Lsg.	Lösung

M	molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichts-Cut-Off
n nano	(10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (nitrilo-tri-acetic-acid)
nm	Nanometer
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Piko-Mol
PVDF	Poly-Vinyliden-Di-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TetR	Tetrazyklin-Resistenz
TIGR	The Institute of Genomic Research
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
ü/N	über Nacht
(v/v)	Volumenprozent
V	Volt (Einheit der Spannung)
Vol	Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil
(w/w)	Gewichtsprozent
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. K. N. Timmis für die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Bereich Mikrobiologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. G. S. Chhatwal danke ich für die Schaffung des wissenschaftlichen Umfelds während der Durchführung der Arbeit in der Abteilung Mikrobielle Pathogenität sowie für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dieter Jahn danke ich für die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Sven Hammerschmidt für die interessante Themenstellung, die gute wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft meine Doktorarbeit von Würzburg aus zu betreuen. Ich bedanke mich auch für die schnelle Durchsicht des Manuskriptes.

Für die großartige Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der 2D möchte ich gerne Max Schobert und Martin Eschbach von der AG Jahn danken. Für viele interessante Anregungen auf dem Gebiet der Proteomforschung danke ich Lothar Jänsch und seiner Arbeitsgruppe. Ich danke Prof. Dr. M. Hecker für die Möglichkeit der Nutzung der Proteom-Plattform seines Instituts. Vielen Dank an Susanne Engelmann für die sehr nette und kompetente Betreuung während meines Greifswald-Aufenthalts.

Für die tatkräftige Unterstützung während der Arbeiten im Labor möchte ich gerne Nina Janze, Bianca Karge und Sieglinde Keilholz-Gast herzlich danken.

Besonders danken möchte ich Inka Sastella für die immerwährende Unterstützung bei allen fachlichen und nicht-fachlichen Fragen und Oliver Goldmann für die Hilfe bei den Tierexperimenten und anderen größeren und kleineren Problemen.

Ein besonderer Dank gilt den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe in Braunschweig für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei allen durchlebten Höhen und Tiefen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den „Biozentrologen“ für die entspannte und nette Arbeitsatmosphäre.

Ein Riesen-Dankeschön geht an Simone Bergmann für die engagierte Unterstützung bei der Zusammenschrift meiner Doktorarbeit.

Meiner Mutter Renate Bracht, meinen Brüdern Karl-Friedrich und Armin Bracht danke ich dafür, dass sie mich immer mit allen Mitteln unterstützt haben.